

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL**



**TESIS DOCTORAL**

**Empleo de antioxidantes naturales procedentes de la uva y la aceituna para conservar la calidad de la carne de cordero enriquecida en ácidos grasos omega-3**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Iria Muíño Vizcaíno**

DIRECTORES

**María Teresa Díaz Díaz-Chirón**  
**Vicente Cañeque Martínez**  
**Sara Lauzurica Gómez**

Madrid, 2018

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Producción Animal



**EMPLEO DE ANTIOXIDANTES NATURALES  
PROCEDENTES DE LA UVA Y LA  
ACEITUNA PARA CONSERVAR LA  
CALIDAD DE LA CARNE DE CORDERO  
ENRIQUECIDA EN ÁCIDOS GRASOS  
OMEGA-3**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Iria Muño Vizcaíno**

Bajo la dirección de los Doctores:

M<sup>a</sup> Teresa Díaz Díaz-Chirón

Vicente Cañeque Martínez

Sara Lauzurica Gómez

**Madrid, 2017**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**TESIS DOCTORAL**

**EMPLEO DE ANTIOXIDANTES NATURALES  
PROCEDENTES DE LA UVA Y LA  
ACEITUNA PARA CONSERVAR LA  
CALIDAD DE LA CARNE DE CORDERO  
ENRIQUECIDA EN ÁCIDOS GRASOS  
OMEGA-3**

**Iria Muño Vizcaíno**

**Madrid, abril del 2017**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**TESIS DOCTORAL**

**EMPLEO DE ANTIOXIDANTES NATURALES  
PROCEDENTES DE LA UVA Y LA  
ACEITUNA PARA CONSERVAR LA  
CALIDAD DE LA CARNE DE CORDERO  
ENRIQUECIDA EN ÁCIDOS GRASOS  
OMEGA-3**

**Memoria presentada por la Licenciada en Biología**

**Iria Muíño Vizcaíno para optar al grado**

**de Doctor en Veterinaria**

**Madrid, abril del 2017**



**Dra. M<sup>a</sup> Teresa Díaz Díaz-Chirón**, Científico Titular del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, **Dr. Vicente Cañeque Martínez**, Investigador Titular del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, y **Dra. Sara Lauzurica Gómez**, Profesor Titular del Departamento de Animal de la Universidad Complutense de Madrid,

**CERTIFICAN:** Que la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada: “Empleo de antioxidantes naturales procedentes de la uva y la aceituna para conservar la calidad de la carne de cordero enriquecida en ácidos grasos omega-3”, de la que es autora la Licenciada en Biología **Dña. Iria Muño Vizcaíno**, ha sido realizada bajo su dirección conjunta, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Para que conste, firman la presente en Madrid, abril del 2017.

Fdo.: M<sup>a</sup> Teresa Díaz

Fdo.: Vicente Cañeque

Fdo.: Sara Lauzurica



La autora de esta Tesis Doctoral ha sido beneficiaria de una beca y contrato de Formación de Personal Investigador (FPI) del Subprograma FPI-INIA del Programa Nacional de Formación de Recursos Humanos de Investigación, en el marco del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011 (Referencia: RTA2009-00087-C02-01).

Este trabajo se ha realizado dentro de un Proyecto Coordinado entre el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y la Universidad Complutense de Madrid (UCM), y ha sido financiado por el proyecto RTA2009-00087-C02-00 del INIA (Ministerio de Ciencia e Innovación), Subprograma de Proyectos de Investigación Fundamental orientada a los recursos y tecnologías agrarias en coordinación con la CCAA, del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, y por el proyecto P2009/AGR-1704 de la Comunidad de Madrid.



# Índices

---



**Índice de contenidos**

Índices.....	I
Índice de contenidos .....	III
Índice de tablas .....	VI
Índice de figuras .....	VII
Abreviaturas.....	IX
Resumen/Abstract.....	1
Resumen .....	3
Abstract.....	7
1. Introducción general y objetivos .....	11
2. Revisión bibliográfica.....	19
2.1. Características de la grasa de cordero.....	21
2.2. Modificación del perfil lipídico de la carne de rumiantes .....	25
2.2.1. Estrategias alimentarias en rumiantes.....	26
2.2.2. Adición directa en carne y producto cárnico .....	29
2.3. Procesos oxidativos en la carne y producto cárnico .....	31
2.3.1. Influencia del contenido en ácidos grasos omega-3 .....	37
2.4. Antioxidantes.....	40
2.5. Compuestos fenólicos.....	44
2.5.1. Origen y estructura de los compuestos fenólicos .....	44
2.5.2. Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos .....	52
2.5.3. Propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos .....	47
2.5.4. Compuestos fenólicos de la uva: Caracterización .....	55

2.5.5. Compuestos fenólicos de la aceituna: Caracterización.....	57
2.5.6. Aplicación de los compuestos fenólicos en carne y producto cárnico .....	58
2.5.6.1. Empleo de compuestos fenólicos en alimentación animal .....	58
2.5.6.2. Empleo de compuestos fenólicos en producto cárnico.....	64
2.6. Vitamina E.....	69
2.6.1. Origen y estructura de la vitamina E .....	69
2.6.2. Biodisponibilidad y metabolismo de la vitamina E.....	65
2.6.3. Propiedades antioxidantes de la vitamina E .....	71
2.6.4. Aplicación de la vitamina E en carne y producto cárnico .....	73
2.6.4.1. Empleo de la vitamina E en alimentación animal .....	73
2.6.4.2. Empleo de la vitamina E en producto cárnico .....	77
3. Resultados y discusión.....	81
3.1. Artículo I. Effect of dietary supplementation with red wine extract or vitamin E, in combination with linseed and fish oil, on lamb meat quality .....	83
3.2. Artículo II. Use of red wine polyphenols as a natural preservative in health- promoting omega-3 fatty acid-enriched lamb patties .....	93
3.3. Artículo III. Valorization of an extract from olive oil waste as a natural antioxidant for reducing meat waste resulting from oxidative processes.....	123
4. Discusión general .....	135
4.1. Empleo de extracto de vino tinto en alimentación animal vs. adición directa en producto cárnico para conservar la calidad de la carne de cordero enriquecida en ácidos grasos omega-3 .....	137
4.2. Empleo de antioxidantes naturales en producto cárnico enriquecido en ácidos grasos omega-3 para conservar su calidad: extracto de vino tinto vs. extracto de aceituna .....	145

---

5. Conclusiones.....	155
6. Referencias bibliográficas .....	159
ANEXOS .....	181
ANEXO 1. Especificaciones del extracto de vino tinto según las indicaciones del fabricante .....	183
ANEXO 2. Especificaciones del extracto de aceituna según las indicaciones del fabricante .....	188
ANEXO 3. Valores del color instrumental del músculo <i>longissimus</i> enriquecido en PUFA n-3 de corderos suplementados en la dieta con RWE .....	190
ANEXO 4. Evolución del porcentaje de MetMb del músculo <i>longissimus</i> enriquecido en PUFA n-3 de corderos suplementados en la dieta con RWE.....	191
ANEXO 5. Contenido de PUFA LCh en hamburguesas de cordero enriquecidas en PUFA n-3 formuladas con extracto de oliva .....	192

## **Índice de tablas**

Tabla 1. Relación de ácidos grasos de interés para la salud humana en la grasa intramuscular de corderos procedentes de diferentes sistemas de producción..... 25

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema general del proceso de lipólisis y biohidrogenación del ácidos linolénico (C18:3 n-3) y el ácido linoleico (C18:2 n-6) en el rumen, con los intermediarios más comunes .....	23
Figura 2. Esquema de las interrelaciones de los distintos estados de óxido-reducción de la mioglobina .....	34
Figura 3. Modificaciones de la estructura proteica causada por la oxidación.....	36
Figura 4. Estructura química de los tocoferoles y los tocotrienoles.....	70
Figura 5. Actividad antioxidante del $\alpha$ -tocoferol como captador de radicales en el proceso de oxidación lipídica .....	72



# **Abreviaturas**

---



## **Abreviaturas**

AH: antioxidante

LA: ácido grasos linoleico (C18:2 n-6)

ALA: ácido grasos linolénico (C18:3 n-3)

CLA: ácido linolénico conjugado

CTF: contenido total de compuestos fenólicos

DeoxiMb: deoximioglobina

DHA: ácido docosahexaenoico (C22:6)

DPA: ácido docosapentaenoico (C22:5)

EPA: ácido eicosapentaenoico (C20:5)

ERO: especie reactiva de oxígeno

GAE: equivalentes de ácido gálico

HiOx-MAP: envasado en atmósfera modificada con alta proporción de oxígeno

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxido de hidrógeno

L•: radical lipídico

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LH: ácido graso insaturado

LO•: radical alcoxilo lipídico

LOO•: radical peroxilo

LOOH: hidroperóxido lipídico

MAP: envasado en atmósfera modificada

Mb: mioglobina

MetMb: metamioglobina

MS: materia seca

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados

n-3: ácidos grasos omega-3

$O_2^{\bullet-}$ : radical superóxido

$OH^{\bullet}$ : radical hidroxilo

$OH_2^{\bullet}$ : radical perhidroxilo

OxiMb: oximioglobina

$P^{\bullet}$ : radical proteico

PH: proteína

$PO^{\bullet}$ : radical alcoxilo proteico

$POO^{\bullet}$ : radical peroxilo proteico

POOH: hidroperóxido proteico

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

PUFA LCh: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

$R^{\bullet}$ : radical iniciador de los procesos oxidativos

$RL^{\bullet}$ : radical libre

RLH: especie no radical

RNS: especies reactivas del nitrógeno

ROS: especies reactivas del oxígeno

SFA: ácidos grasos saturados

TPA: análisis del perfil de textura

UFA: ácidos grasos insaturados

# **Resumen/Abstract**

---



## **Resumen**

La carne de los rumiantes se caracteriza por presentar una alta proporción de ácidos grasos saturados (SFA) y una baja proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Debido a esta baja relación PUFA/SFA su consumo se ha asociado con una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares y con algunos tipos de cáncer. Por este motivo, se han llevado a cabo numerosos estudios encaminados a cambiar el perfil de ácidos grasos de la carne de rumiantes con el fin de aumentar la relación PUFA/SFA hasta los valores recomendados por las autoridades sanitarias.

Las estrategias empleadas para aumentar la proporción de PUFA n-3 en la carne de rumiante se engloban en dos: suplementación de la alimentación de los animales y reformulación de los productos cárnicos, en ambas incluyendo fuentes lipídicas vegetales o marinas ricas en PUFA n-3. Sin embargo, estos ácidos grasos son muy susceptibles a los procesos oxidativos lo que lleva a una disminución de la vida útil de la carne durante la conservación.

Por lo tanto, el aumento de PUFA n-3 en la carne y sus derivados debería de ir acompañado del uso de antioxidantes para prevenir o frenar el desarrollo de los procesos oxidativos. Uno de los antioxidantes más empleados en nutrición animal es la vitamina E, que reduce notablemente el deterioro de la carne causado por la oxidación y, también ha resultado efectiva como aditivo en productos cárnicos. En la última década, ha habido un gran interés por el estudio de compuestos bioactivos de origen vegetal que presentan gran actividad antioxidante. Se trata de los compuestos fenólicos que se han incorporado en la alimentación animal y en el procesado de derivados cárnicos con resultados muy positivos, limitando los procesos oxidativos durante la conservación.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el **objetivo** de esta Tesis Doctoral fue evaluar el empleo de compuestos fenólicos procedentes de la uva y de la aceituna como antioxidantes naturales, en comparación con el empleo de vitamina E, incorporados en la alimentación animal (cordero) y/o en la formulación de derivados cárnicos (hamburguesa de cordero) mediante el estudio de su efecto en la estabilidad oxidativa y

sensorial de la carne enriquecida en PUFA n-3 durante la conservación. Para cumplir el objetivo planteado, se llevaron a cabo tres experiencias que se detallan a continuación.

En la primera experiencia, se formuló una dieta básica de engorde para corderos enriquecida en PUFA n-3 (6% de lino extrusado y 1% de aceite de pescado desodorizado) para estudiar el efecto de la incorporación de dos compuestos antioxidantes, extracto de vino tinto (RWE) y vitamina E (VE), en la estabilidad oxidativa y sensorial de la carne. Para ello se utilizaron treinta corderos macho de raza Manchega con un peso vivo medio inicial de 14,3 kg, que fueron asignados aleatoriamente a tres tratamientos experimentales: grupo C (control, sin incorporación de antioxidantes), grupo RWE (900 mg de RWE/kg pienso) y grupo VE (300 mg de acetato de  $\alpha$ -tocoferilo/kg pienso). Los corderos fueron sacrificados al alcanzar un peso vivo medio de 26,6 kg. El lomo (músculo *longissimus thoracic et lumborum*) fue cortado en chuletas, las cuales se envasaron en atmósfera modificada con alta proporción de oxígeno (HiOx-MAP) (70% O<sub>2</sub>: 30% CO<sub>2</sub>) y se conservaron durante 12 días a 4°C. En cada día de muestreo (0, 6 y 12) se analizó la oxidación lipídica y proteica, el color y la proporción de ácidos grasos. Para el análisis sensorial se usaron las chuletas en los días de muestreo 0 y 6.

El grupo VE presentó menor oxidación lipídica y proteica, y menor decoloración en comparación con los grupos C y RWE, que no difirieron entre ellos. El porcentaje de PUFA n-3 se mantuvo estable durante la conservación en el grupo VE, lo cual podría estar relacionado con una menor intensidad de los procesos oxidativos en la carne. El grupo RWE presentó una proporción de EPA mayor y una relación n-6/n-3 menor con respecto al grupo C, lo cual pudo indicar una interferencia de los polifenoles del RWE con el proceso de biohidrogenación en el rumen. Por último, en el grupo VE se vio reducido el deterioro sensorial de la carne en comparación con el grupo RWE y C, que no presentaron diferencias entre ellos. De esta experiencia se concluye que la incorporación del VE en la dieta de los corderos retrasó los procesos oxidativos en la carne durante la conservación, mientras que el uso del RWE en la alimentación de los animales no presentó ningún efecto en la estabilidad oxidativa de la carne durante su conservación, aunque mejoró el perfil de ácidos grasos al presentar una mayor proporción de PUFA n-3 que la carne de los corderos sin RWE en la dieta.

En la segunda experiencia, se prepararon hamburguesas de cordero a partir de piernas de cordero ligero y se formularon con aceite de pescado desodorizado para obtener una cantidad de PUFA de cadena larga (LCh) en la carne de 100 mg/100 g carne. Se estudió el efecto de la incorporación de tres niveles de extracto de vino tinto (RWE) y de un nivel de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol - TOC). Para la formulación con el RWE se tuvo en cuenta su contenido total en compuestos fenólicos (CTF) expresado en equivalentes del ácido gálico (GAE). El RWE presentó un CTF de 550 mg GAE/g extracto. Se fabricaron cuatro lotes: grupo CON (control, sin incorporación de antioxidantes), grupo RWE50 (50 mg GAE de RWE/kg carne), grupo RWE100 (100 mg GAE de RWE/kg carne), grupo RWE200 (200 mg GAE de RWE/kg carne) y grupo TOC (100 mg  $\alpha$ -tocoferol/kg carne). Las hamburguesas se conservaron en HiOx-MAP (70% O<sub>2</sub>: 30% CO<sub>2</sub>) durante 9 días a 4°C. A tiempo inicial (día 0) se midió la capacidad de la carne de ceder átomos de hidrógeno (ensayo ORAC) y la capacidad de reducir metales (ensayo FRAP). En los días de muestreo (0, 3, 6 y 9) se analizó la oxidación lipídica y proteica, el color y el contenido en PUFA LCh. Para el análisis sensorial se emplearon las hamburguesas a día 0 y 3 de la conservación.

No hubo diferencias entre los distintos grupos en los resultados obtenidos con el ensayo ORAC o el ensayo FRAP. La oxidación lipídica se redujo durante toda la conservación en los tres grupos con RWE pero no presentaron ningún efecto en la oxidación proteica, mientras que el grupo TOC no previno la oxidación lipídica ni la proteica (medida por la formación de grupos carbonilo). La incorporación de la dosis más alta de RWE en las hamburguesas (grupo RWE200) resultó más efectivo previniendo la decoloración de la carne en comparación con el grupo CON, mientras que los grupos RWE50 y RWE100 tuvieron un valor intermedio. El grupo RWE200 presentó un mayor contenido de PUFA LCh al final de la conservación en comparación con el grupo control. En relación al análisis sensorial, las únicas diferencias observadas tuvieron lugar en el grupo RWE200 que presentó menor olor a cordero y los panelistas detectaron un olor extraño, posiblemente debido al propio olor del extracto, aunque este hecho no afectó a la aceptabilidad global del producto. Por lo tanto, la mayor eficacia sobre la estabilidad oxidativa de las hamburguesas de cordero se observó con la incorporación del mayor nivel de RWE (RWE200), mientras que los efectos de la incorporación del TOC fueron mucho menores.

En la tercera experiencia, se prepararon hamburguesas de cordero a partir de piernas de cordero ligero y se formularon con aceite de pescado desodorizado para obtener una cantidad de PUFA LCh en la carne de 100 mg/100 g carne. Se estudió el efecto de la incorporación de tres niveles de extracto de aceituna (OE) procedente del alpechín generado durante la elaboración del aceite de oliva. Para la formulación con el OE se tuvo en cuenta su CTF, que resultó en 348,2 mg GAE/g extracto. Se fabricaron tres lotes: grupo CON (control, sin incorporación de antioxidantes), grupo OE100 (100 mg GAE de OE/kg carne), grupo OE200 (200 mg GAE de OE/kg carne) y grupo OE400 (400 mg GAE de OE/kg carne). Las hamburguesas se conservaron en HiOx-MAP (70% O<sub>2</sub>: 30% CO<sub>2</sub>) durante 9 días a 4°C. A tiempo inicial (día 0) se midió la capacidad antioxidante de la carne (ensayos ORAC y FRAP). En los días de muestreo (0, 3, 6 y 9) se analizó la oxidación lipídica y proteica, el color y el contenido en PUFA LCh. Para el análisis sensorial se emplearon las hamburguesas a día 0 y 3 de la conservación.

No se observaron diferencias entre los grupos en el ensayo ORAC, sin embargo para el ensayo FRAP se observó una relación dosis-efecto de la adición del OE. La oxidación lipídica y proteica (medida por la formación de grupos carbonilo) se previno con la incorporación de los tres niveles del OE, en comparación con el grupo CON. La decoloración de la carne resultó menor en las hamburguesas con los dos niveles superiores del OE (OE200 y OE400) y el contenido en PUFA LCh fue mayor en relación al grupo CON. Con respecto a la evaluación sensorial, los resultados indican que la incorporación del OE en las hamburguesas dio lugar a la aparición de olores y sabores extraños, relacionados por los panelistas con la aceituna, lo que provocó que tanto el olor como el sabor a cordero obtuviera puntuaciones menores que el grupo CON, pero sin llegar a afectar a la valoración global de las hamburguesas. Sin embargo, el olor y sabor a rancio se detectó en menor medida que en el grupo CON, posiblemente por una mayor estabilidad oxidativa durante la conservación de las hamburguesas con el OE. Podemos concluir, por lo tanto, que la incorporación del OE en las hamburguesas aumentó eficazmente la vida útil en términos de estabilidad oxidativa, siendo este efecto más patente con el empleo de las dos dosis mayores (OE200 y OE400).

## **Abstract**

Meat from ruminants is characterized by a high proportion of saturated fatty acids (SFA) and a low proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFA). Due to this low PUFA/SFA ratio, its consumption has been associated with a higher incidence of cardiovascular diseases and with some types of cancer. For this reason, a series of studies have been conducted aimed at changing the fatty acid profile of ruminant meat in order to increase the PUFA/SFA ratio to the values recommended by health authorities.

The strategies used to increase the proportion of n-3 PUFA in ruminant meat are twofold: supplementation of animal feeding and reformulation of meat products, both including plant or marine lipid sources rich in n-3 PUFA. However, these fatty acids are very susceptible to oxidative processes, which lead to a decrease in the shelf life of the meat during the storage period.

Therefore, the increase of n-3 PUFA in meat and meat products should imply the use of antioxidants to prevent or slow down the development of oxidative processes. One of the antioxidants most used in animal nutrition is vitamin E, which reduces significantly the deterioration of the meat due to the oxidation, also proving effective as an additive in meat products. In the last decade, there has been a great interest in the study of bioactive compounds of plant origin that present high antioxidant activity. These are phenolic compounds that have been incorporated into animal feed and in processing of meat products with very positive results, limiting the oxidative processes during the storage period.

Taking the aforementioned into account, the **objective** of this Thesis was to evaluate the use of phenolic compounds from grapes and olives as natural antioxidants, by comparison with vitamin E, incorporated in animal feed (lamb) and/or in the formulation of meat products (lamb patties) by studying its effect on the oxidative and sensory stability of the n-3 PUFA-enriched meat during a storage period. In order to achieve the stated objective, three studies were carried out that are detailed below.

In the first study, a basal fattening diet for lambs enriched in n-3 PUFA (6% extruded linseed and 1% deodorised fish oil) was formulated to study the effect of the

incorporation of two antioxidant compounds, red wine extract (RWE) and vitamin E (VE), in the oxidative and sensory stability of the meat. Thirty weaned male Manchego lambs with an average initial live weight of 14.3 kg were randomly assigned to three experimental treatments: C group (control, without incorporation of antioxidants), RWE group (900 mg RWE/kg feed) and VE group (300 mg  $\alpha$ -tocopheryl acetate/kg feed). The lambs were sacrificed at an average live weight of 26.6 kg. The loin (*longissimus thoracic et lumborum* muscle) was cut into chops, which were packaged in modified atmosphere packs with a high proportion of oxygen (HiOx-MAP) (70% O<sub>2</sub>: 30% CO<sub>2</sub>) and stored for 12 days at 4 °C. On each sampling day (0, 6 and 12) the lipid and protein oxidation, colour and proportion of fatty acids were analysed. To perform the sensory analysis, the chops were used on sampling days 0 and 6.

The VE group had lower lipid and protein oxidation, and less discoloration compared to C and RWE groups, which did not differ between them. The percentage of n-3 PUFA remained stable during storage in the VE group, which could be related to a lower intensity of the oxidative processes in the meat. The RWE group presented a higher EPA proportion and a lower n-6/n-3 ratio than the C group, which could indicate an interference of the RWE polyphenols with the biohydrogenation process in the rumen. Finally, in the VE group the sensorial deterioration of the meat was reduced in comparison with the RWE and C groups, which did not present differences between them. This study concludes that the incorporation of VE into the diet of lambs delayed the oxidative processes in the meat during the storage period. On the contrary, the use of RWE in animal feed had no effect on the oxidative stability of the meat during the storage period, although it improved fatty acids profile presenting a higher proportion of n-3 PUFA than the lamb meat without RWE in the diet.

In the second study, lamb patties were prepared from light lamb legs and formulated with deodorised fish oil to obtain an amount of 100 mg long chain (LCh) PUFA/100 g meat. The effect of the incorporation of three levels of red wine extract (RWE) and a level of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol - TOC) was studied. For the formulation with the RWE its total phenolic content (TPC) expressed as gallic acid equivalents (GAE) was taken into account. The RWE presented a TPC of 550 mg GAE/g extract. Four batches were made: CON group (control, without the incorporation of antioxidants), RWE50 group (50 mg GAE of RWE/kg meat), RWE100 group (100 mg GAE of RWE/kg

meat), RWE200 group (200 mg GAE of RWE/kg meat) and TOC group (100 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg meat). The patties were stored in HiOx-MAP (70% O<sub>2</sub>: 30% CO<sub>2</sub>) for 9 days at 4 °C. At commencement (day 0) the ability of the meat to yield hydrogen atoms (ORAC assay) and the ability to reduce metals (FRAP assay) was measured. On the sampling days (0, 3, 6 and 9) the lipid and protein oxidation, the colour and the LCh PUFA content were analysed. For the sensory analysis the patties were used at days 0 and 3 of storage period.

There were no differences between the different groups in the results obtained with the ORAC or FRAP assay. Lipid oxidation was reduced throughout the storage period in the three groups with RWE but had no effect on protein oxidation, whereas the TOC group did not prevent lipid oxidation or protein oxidation (measured by the formation of carbonyl groups). The incorporation of the highest dose of RWE into patties (RWE200 group) resulted more effective in preventing discoloration of the meat compared to the CON group, while the RWE50 and RWE100 groups had an intermediate value. The RWE200 group showed a higher content of LCh PUFA than the CON group at the end of the storage period. In relation to the sensory analysis, the only observed differences occurred in the RWE200 group, which had a lower lamb odour and the panellists detected an odd odour, possibly due to the odour of the extract itself, although no differences were observed in overall liking scores. Therefore, the greatest efficacy on the oxidative stability of lamb patties was observed with the incorporation of the highest level of RWE (RWE200), while the effects of incorporation of TOC were much lower.

In the third study, lamb patties were prepared from light lamb legs and formulated with deodorised fish oil to obtain an amount of 100 mg of LCh PUFA/100 g meat. The effect of the incorporation of three levels of olive extract (OE) from olive wet cake generated during the elaboration of olive oil was studied. For the OE formulation, its TPC was taken into account, resulting in 348.2 mg GAE/g extract. Three batches were made: CON (control, without incorporation of antioxidants), OE100 (100 mg OE GAE/kg meat), OE200 (200 mg OE GAE/kg meat) and OE400 (400 mg OE GAE/kg meat). The patties were preserved in HiOx-MAP (70% O<sub>2</sub>: 30% CO<sub>2</sub>) for 9 days at 4 °C. At commencement (day 0) the antioxidant capacity (ORAC and FRAP assays) was measured. On sampling days (0, 3, 6 and 9) the lipid and protein oxidation, the colour

and the LCh PUFA content were analyzed. For the sensory analysis, patties were used on days 0 and 3 of the conservation.

No differences were observed between groups in the ORAC assay, however for the FRAP assay, a dose-effect relationship was observed for OE addition. Lipid and protein oxidation (measured by the formation of carbonyl groups) was prevented with the incorporation of the three levels of OE, compared to the CON group. The discoloration of meat was lower in patties with the two upper levels of OE (OE200 and OE400) and the content of LCh PUFA was higher, in comparison with the CON group. For the sensory evaluation, the results indicate that the incorporation of OE into patties resulted in the appearance of odd odours and flavours noted by the panellists, which was related to the olive, which caused that both the odour and the flavour of lamb obtained lower scores than the CON group, although no differences were observed in overall linking scores. However, fish odour and flavour was detected to a lesser extent than in the CON group, possibly due to greater oxidative stability during the maintenance of patties with OE. We can therefore conclude that incorporation of OE into patties effectively increased shelf life in terms of oxidative stability, which is more evident with the use of the two higher doses (OE200 y OE400).

# **1. Introducción general**



La carne de los rumiantes es un alimento con gran valor nutritivo global, de tal forma que su consumo proporciona una gran cantidad de nutrientes esenciales. Entre estos nutrientes destacan las proteínas, componente mayoritario de la carne magra (entre el 16 y 22%), de alto valor biológico ya que contienen todos los aminoácidos esenciales necesarios para una correcta nutrición humana, además de presentar alta digestibilidad y absorción. La carne también es fuente importante de minerales, como el zinc, el selenio y el hierro (siendo el hierro hemínico mucho más asimilable que el no hemínico), y de vitaminas, especialmente del grupo B (principalmente B3, B6 y B12) (Díaz, Sánchez, Martínez, Vieira y García, 2005).

Otro componente de gran importancia en la carne es su grasa, sobre todo por su efecto en las características sensoriales de la misma. Su contenido es muy variable entre las distintas piezas de la canal (entre un 2% y un 20%) y depende también de factores intrínsecos, como la especie, la raza, la edad y el sexo, y de factores extrínsecos, fundamentalmente del tipo de alimentación (Díaz, Sánchez, et al., 2005). En concreto, la carne de los rumiantes presenta un alto contenido en ácidos grasos saturados (SFA) y una menor proporción de insaturados (UFA) como consecuencia del proceso de biohidrogenación que tiene lugar en el rumen por parte de la microbiota presente (Buccioni, Decandia, Minieri, Molle y Cabiddu, 2012).

Tradicionalmente, la calidad de un alimento estaba relacionada solamente con la seguridad alimentaria, los aspectos sensoriales y la vida útil del producto. Sin embargo, en las últimas décadas, dentro de calidad de un alimento se incluyen aspectos nutricionales, de bienestar, y de salud (Troy y Kerry, 2010). En este sentido, el alto contenido en SFA de la carne, principalmente la de rumiante, dista bastante de cumplir con las recomendaciones nutricionales de las autoridades y organismos sanitarios, como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010), que abogan por un mayor consumo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), especialmente de los pertenecientes a la familia de los ácidos grasos omega-3 (n-3), evitando el exceso de consumo de SFA, relacionados con una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer (Williams, 2000).

Por este motivo, existe un gran interés por parte de la comunidad científica y de la industria alimentaria en la modificación del perfil lipídico de la carne de rumiantes, para

acercarse a las recomendaciones nutricionales a través de diferentes estrategias encaminadas a disminuir el contenido en SFA y aumentar el contenido en ácidos n-3, especialmente aquellos ácidos grasos de cadena larga (PUFA LCh) (Bernardi, Bertol, Pflanzler, Sgarbieri y Pollonio, 2016). Los ácidos grasos PUFA LCh presentan numerosos beneficios para la salud humana, como propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antiaterogénicas (Simopoulos, 2008). Con este objetivo, se han llevado a cabo diferentes estrategias nutricionales como es la suplementación de la alimentación de los animales con fuentes ricas en ácidos grasos n-3, como la semilla de lino y el aceite de pescado (Díaz, Cañeque, Sánchez, Lauzurica, Pérez, Fernández, Álvarez y De la Fuente, 2011), así como la incorporación de las fuentes de n-3 (lípidos vegetales o marinos) en la formulación de derivados y productos cárnicos durante el proceso de fabricación (Jiménez-Colmenero, 2007). De esta forma, se obtiene carne y productos cárnicos con un mayor contenido en PUFA n-3, como el ácido linolénico (ALA), y PUFA LCh, como el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA).

Sin embargo, esta carne con un elevado contenido en PUFA n-3 es muy susceptible a sufrir procesos oxidativos ya que estos ácidos grasos tiene un gran número de enlaces dobles que son muy fácilmente atacados por los radicales libres generados en los sistemas biológicos (Schaefer, Qian y Buettner, 2000). Estos fenómenos oxidativos llevan a la disminución de la calidad nutricional y organoléptica de la carne y sus derivados. La oxidación lipídica provoca una pérdida de PUFA n-3, así como la formación de compuestos volátiles que afectan al aroma y al sabor, reduciendo el olor y el sabor propio de la carne y originando connotaciones desagradables como el olor y el sabor a rancio (Campo, Nute, Hughes, Enser, Wood y Richardson, 2006), además de originar compuestos potencialmente perjudiciales para la salud (Kanner, 1994). Por otro lado, las modificaciones ocasionadas en las estructuras proteicas como consecuencia de los fenómenos oxidativos llevan a la disminución en el contenido de aminoácidos esenciales y se ha visto que pueden tener efecto en la digestibilidad y absorción de los mismos, y además, modifican las propiedades sensoriales relacionadas con la textura, como son la ternura y la jugosidad de la carne (Soladoye, Juárez, Aalhus, Shand y Estévez, 2015). El color de la carne también se va a ver afectado por estos procesos

oxidativos, pasando de un color rojo a un color pardo que es frecuentemente rechazado por los consumidores (Mancini y Hunt, 2005).

Por lo tanto, se hace necesario el uso de antioxidantes para prevenir los procesos oxidativos y mantener la calidad de la carne y sus derivados durante la conservación, especialmente en presencia de una alta cantidad de PUFA n-3.

Los antioxidantes más utilizados en la industria alimentaria desde hace décadas han sido el butil-hidroxi-anisol (BHA), el butil-hidroxi-tolueno (BHT), el galato de propilo (PG) y el terbutil-hidroquinona (TBHQ) (Shahidi, 2010). Sin embargo, los antioxidantes sintéticos están muy cuestionados desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, lo que lleva a un rechazo por parte del consumidor que cada vez exige más productos sin aditivos sintéticos (Devcich, Pedersen y Petrie, 2007). Por este motivo, está en gran auge la búsqueda de antioxidantes naturales, generalmente de procedencia vegetal, que cumplan los requisitos del consumidor respecto a los aditivos sintéticos, y que mantengan la calidad organoléptica esperada.

Uno de los antioxidantes más empleados para la conservación de la carne y productos cárnicos es la vitamina E. El estudio del efecto de la vitamina E en cantidades mayores de las recomendadas para cubrir las necesidades nutricionales de los animales, ha dado lugar a una gran cantidad de resultados positivos en relación a la prevención de los procesos oxidativos en la carne (Liu, Lanari y Schaefer, 1995). Del mismo modo, la vitamina E se ha incluido durante la elaboración de productos cárnicos pero dando lugar a diferentes resultados, desde no tener efecto en la estabilidad oxidativa de la carne (Vissa y Cornforth, 2006) a presentar un efecto claro (Botsoglou, Govaris, Ambrosiadis, Fletouris y Papageorgiou, 2014), aunque generalmente es menor que el que tiene la incorporación de vitamina E en la dieta de los animales (Liu et al., 1995).

Los compuestos fenólicos, principal producto del metabolismo secundario de las plantas, presentan una alta actividad antioxidante que depende fundamentalmente de su estructura química, e incluye la neutralización de radicales libres y la quelación de metales (Shahidi y Naczek, 2004b). Los compuestos fenólicos están siendo ampliamente investigados como antioxidantes naturales para prevenir los procesos oxidativos en la carne y productos cárnicos, tanto empleados en la alimentación animal, como incorporados directamente en el producto cárnico por medios tecnológicos, con

resultados muy positivos (Falowo, Fayemi y Muchenje, 2014). Además, la presencia de estos compuestos en la carne le va a aportar un valor añadido a la misma, ya que los compuestos fenólicos presentan efectos beneficiosos para la salud de los consumidores (Kumar y Pandey, 2013). Los compuestos fenólicos que se han estudiado en la carne y sus derivados para evitar los procesos oxidativos, proceden de muchos orígenes, como son, las frutas, las especias y las plantas aromáticas (Shah, Bosco y Mir, 2014).

La uva (*Vitis vinifera* L.) y la aceituna (*Olea europaea* L.) son dos fuentes importantes de compuestos fenólicos bioactivos. La uva es rica principalmente en flavonoides, como las antocianinas, catequinas o proantocianinas (Fontana, Antonioli y Bottini, 2013), y la aceituna presenta mayoritariamente secoiridoides, como la oleuropeina, y ácidos fenólicos como el hidroxitirosol (Ghanbari, Anwar, Alkharfy, Gilani y Saari, 2012). Los compuestos presentes tanto en la uva como en la aceituna han sido usados como antioxidantes naturales para preservar la calidad de la carne durante su conservación. Así por ejemplo, la suplementación de la dieta de corderos con un extracto de semilla de uva previno la oxidación lipídica de la carne conservada durante 7 días en refrigeración (Jerónimo, Alfaia, Alves, Dentinho, Prates, Vasta, Santos-Silva y Bessa, 2012). De forma similar, la incorporación de un extracto de uva o de aceituna en la formulación de hamburguesas de cordero, previno la oxidación lipídica y la decoloración durante 7 días en refrigeración (Andrés, Petró, Adámez, López y Timón, 2017).

Teniendo en cuenta todo lo mencionado, el **objetivo general** de esta tesis ha sido evaluar la utilización de compuestos fenólicos procedentes de la uva y de la aceituna, como antioxidantes naturales para conservar la calidad de la carne de cordero enriquecida en ácidos grasos omega-3 durante su conservación.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de la incorporación de extracto de vino tinto en comparación con la vitamina E, junto con fuentes ricas en ácidos grasos omega-3, en la dieta de corderos sobre la estabilidad oxidativa y organoléptica de la carne conservada en HiOx-MAP.
- Evaluar el efecto de la incorporación de extracto de vino tinto o de vitamina E, junto con fuentes de ácidos grasos omega-3, en la formulación de hamburguesas de cordero sobre la estabilidad oxidativa y organoléptica de la carne conservada en HiOx-MAP.

- . Evaluar el efecto de la incorporación de extracto de subproductos de la aceituna, junto con fuentes de ácidos grasos omega-3, en la formulación de hamburguesas de cordero sobre la estabilidad oxidativa y organoléptica de la carne conservada en HiOx-MAP.



## **2. Revisión bibliográfica**

---



## 2.1. Características de la grasa de cordero

La carne de cordero se caracteriza por un alto contenido en ácidos grasos saturados (SFA), entre un 40-48%, aunque su dieta, ya sea pasto (rico en ácido linolénico – ALA – ; C18:3 n-3) o concentrado (rico en ácido linoleico – LA –; C18:2 n-6), presente una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Díaz et al., 2005). Casi la mitad de los SFA corresponde al ácido palmítico (C16:0) con una proporción entre 22-25%, y alrededor de una tercera parte están constituidos por el ácido esteárico (C18:0) con una proporción del 12-20% (Díaz et al., 2005). Diferentes investigaciones han puesto de manifiesto que niveles elevados de C16:0 en la dieta incrementa los niveles de colesterol total y LDL (lipoproteínas de baja densidad) en sangre, mientras que el C18:0 no tiene este efecto en el organismo (Williams et al., 2000).

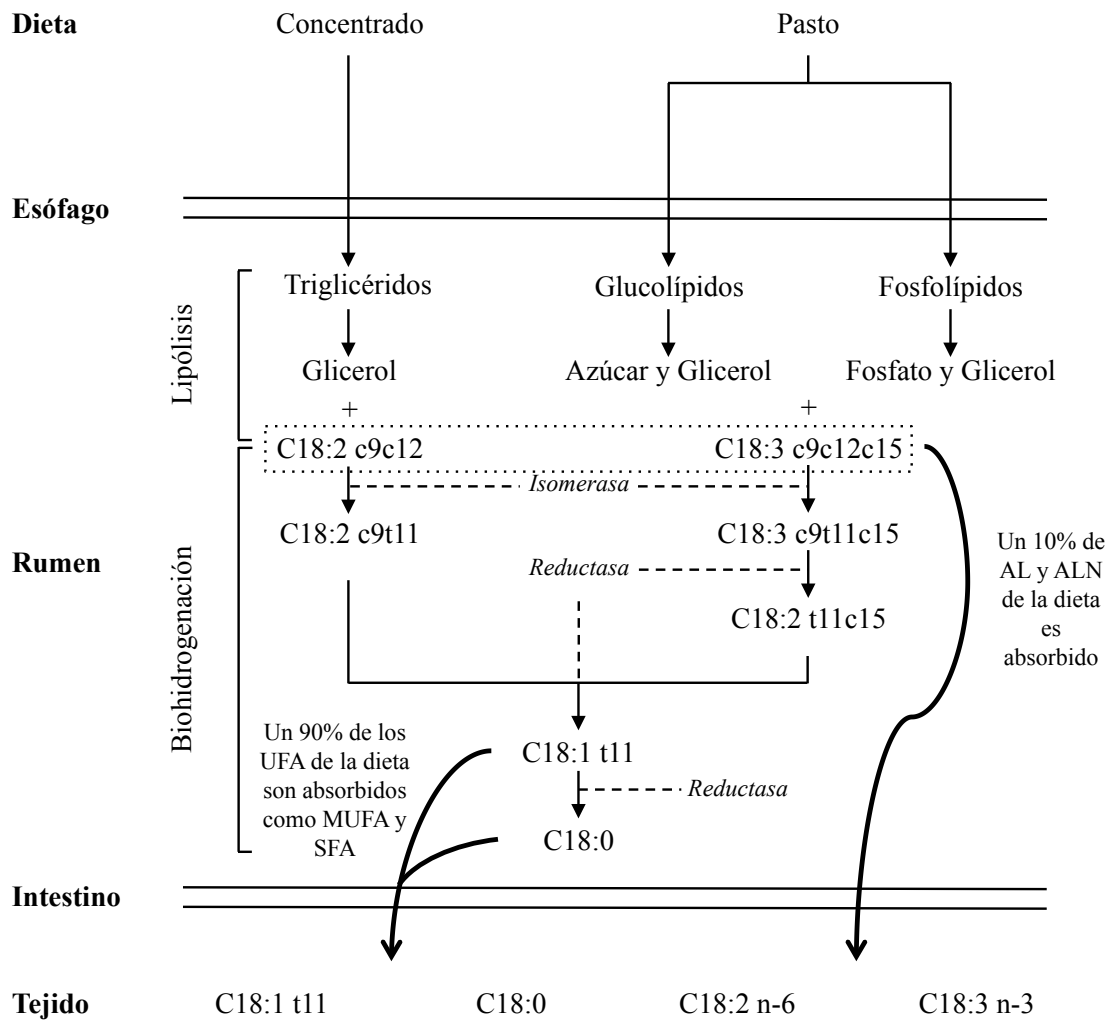
La elevada proporción en SFA de la carne de cordero se debe al proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados (UFA) que tiene lugar en el rumen. A diferencia de lo que ocurre en el sistema digestivo de los animales monogástricos, donde los ácidos grasos pasan a través del estómago sin sufrir modificaciones y son absorbidos e incorporados en los tejidos (Wood, Enser, Fisher, Nute, Sheard, Richardson, Hughes y Whittington, 2008), en los rumiantes los lípidos procedentes de la dieta experimentan una serie de transformaciones que dan lugar a una hidrogenación de los UFA. Primero tiene lugar una lipólisis, en la que los lípidos se hidrolizan dando lugar a ácidos grasos libres y glicerol, fosfatos y/o azúcares en función de la estructura lipídica de la que provengan (triglicéridos, fosfolípidos o glucolípidos). Posteriormente, estos ácidos grasos libres son biohidrogenados por la microbiota del rumen, mediante una serie de reacciones de isomerización y reducción, dando lugar a diferentes productos intermedarios y al ácido esteárico (C18:0) como producto final (Figura 1) (Buccioni, Decandia, Minieri, Molle y Cabiddu, 2012). Hay que tener en cuenta que es un proceso muy complejo y que existen distintas rutas metabólicas para la biohidrogenación del LA y ALA, con diferentes productos intermedarios a los presentados en la Figura 1 (Buccioni et al., 2012). Se ha estimado que entre un 85-100% de ALA y entre un 70-90% de LA procedentes de la dieta son biohidrogenados en el rumen y degradados a ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) o a SFA (Wood et al., 2008). Sin embargo, parte de los ácidos grasos insaturados, sobre un 10% (Wood et al.,

2008), pueden escapar de la hidrogenación ruminal y la dieta puede influir, en cierta medida, en la composición en ácidos grasos de los tejidos de los rumiantes (Scollan, Choi, Kurk, Fisher, Enser y Wood, 2001).

Como resultado de la biohidrogenación ruminal, la carne de cordero también presenta una elevada proporción de MUFA, entre un 37-43% dependiendo del sistema de producción en el que se han criado los animales (Díaz et al., 2005). Dentro de los MUFA destacan el ácido oleico (*cis* 9, C18:1) y el ácido vaccénico (*trans* 11, C18:1) por sus propiedades bioactivas (EFSA, 2010a; Lock, Corl, Barbano, Bauman e Ip, 2004)

En cuanto al contenido en PUFA, la carne de cordero presenta entre un 8-16% del total de ácidos grasos, dependiendo del tipo de animal y de la alimentación recibida (Díaz et al., 2005). Los ácidos grasos LA y ALA no pueden ser sintetizados en el organismo de los mamíferos, por lo que deben de ser aportados a través de la dieta, considerándose ácidos grasos esenciales que, a su vez, van a servir como sustrato para la síntesis de otros ácidos grasos de cadena más larga. Mediante la incorporación de dobles enlaces y la elongación de la cadena carbonada, a partir de LA y ALA se sintetizan los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA LCh) EPA (ácido eicosapentanoico; C20:5), DPA (ácido docosapentanoico; C22:5) y DHA (ácido docosahexanoico; C22:6) (Glaser, Heinrich y Koletzko, 2010; Raes, De Smet y Demeyer, 2004), pero este proceso es muy ineficiente (Williams y Burdge, 2006). Los PUFA LCh se incorporan principalmente en las membranas celulares en forma de fosfolípidos donde ejercen funciones muy importantes contribuyendo a la estructura y funcionalidad de las mismas. Además, la composición mayoritaria en PUFA de los fosfolípidos les hace especialmente sensibles a los procesos alterantes de naturaleza oxidativa ocurridos durante el almacenamiento de la carne.

Los PUFA y en especial los ácidos grasos omega-3 (n-3) como el EPA y el DHA tienen una gran importancia biológica por su repercusión en la salud humana. Así los PUFA n-3 son fundamentales para ciertos tejidos, como el cerebro y la retina (Simopoulos, 2011). Además, se han descrito numerosos beneficios de los PUFA n-3 sobre ciertas enfermedades como cáncer, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide y psoriasis (Simopoulos, 2008).



**Figura 1.** Esquema general del proceso de lipólisis y biohidrogenación del ácido linolénico (C18:3 n-3) y el ácido linoleico (C18:2 n-6) en el rumen, con los intermediarios más comunes.

Dentro de los PUFA también se encuentra el ácido linolénico conjugado (CLA), que es un grupo de isómeros posicionales y geométricos del LA, siendo los dos isómeros predominantes el cis 9, trans 11 C18:2 y el trans 10, cis 12 C18:2 (Rainer y Heiss, 2004). El CLA está presente principalmente en la leche y la carne de rumiantes, ya que se produce mayoritariamente por la flora ruminal en la biohidrogenación del LA (Harfoot y Hazlewood, 1988), aunque también se ha puesto de manifiesto la síntesis endógena de CLA en la glándula mamaria (Griinari, Corl, Lacy, Chouinard, Nurmela y Bauman, 2000) y en la grasa subcutánea e intramuscular (Raes, De Smet, Balcaen, Claeys y Demeyer, 2003). EL CLA tiene unas propiedades bioactivas ampliamente reconocidas (Rainer y Heiss, 2004), entre las que se encuentran sus efectos protectores

frente al desarrollo de cáncer y diabetes, reductores de la grasa corporal, presentando además propiedades antioxidantes (Ha, Storkson y Pariza, 1990).

Como se ha descrito anteriormente, el perfil de ácidos grasos de la carne de cordero varía en función de factores genéticos, como la raza, del sexo y del sistema de producción empleado, en el que se incluyen varios factores como el sistema de cría (si los animales han sido criados en aprisco o pasto), el tipo de pienso utilizado, el peso y la edad de sacrificio, etc. (Díaz et al., 2005; Raes et al., 2004). En la Tabla 1 se presentan las relaciones nutricionales más importantes de la carne de cordero procedente de diferentes sistemas de producción de España, Alemania, Reino Unido y Uruguay (Díaz et al., 2005). En España el sistema de producción es primordialmente intensivo, basado en una alimentación a base de concentrado, con una edad y un peso medio de sacrificio más bajo que en otros países. En el caso del estudio mencionado anteriormente, los corderos fueron de tipo ternasco, sacrificados con una edad de 80-90 días y un peso vivo de 24-26 kg. En cambio, los corderos de Alemania y Reino Unido tuvieron una alimentación a base de pasto suplementada con concentrado y una edad de sacrificio de entre 4 y 6 meses. Por otro lado, los corderos de Uruguay se criaron en extensivo con una alimentación basada sólo en pasto y con dos tipos de cordero, un cordero ligero con una edad de 3-4 meses y un cordero pesado sacrificado a los 12-13 meses. El cordero español presentó una relación PUFA/SFA más elevada y cercana al valor nutricional recomendado de 0,45 (Department of Health, 1994), debida principalmente al alto contenido en LA procedente de la dieta (concentrado) lo cual se reflejaba en la elevada relación C18:2/C18:3 y en la relación de interés nutricional n-6/n-3 la cual supera sustancialmente el valor recomendado de 4 (Department of Health, 1994). El valor más bajo en la relación n-6/n-3 se observó en la carne de cordero de Uruguay, criados exclusivamente en pasto que presenta un alto contenido de ALA y de ahí el valor bajo de la relación C18:2/C18:3.

Las diferencias en el perfil lipídico de la carne como resultado de la alimentación, se van a apreciar principalmente debido al tipo de PUFA mayoritario de la dieta (Díaz, Velasco, Cañeque, Lauzurica, Ruiz de Huidobro, Pérez, González y Manzanares, 2002). Es decir, las mayores diferencias las encontraremos en la relación n-6/n-3 y son debidas a la distinta composición en ácidos grasos de cada sistema de alimentación, el pasto contiene gran cantidad de ALA (C18:3 n-3) mientras que en el concentrado

encontramos mayor cantidad de LA (C18:2 n-6), o debidas a la composición de cada pienso. Este hecho da lugar a una proporción n-6/n-3 más baja y, por lo tanto, una relación más saludable desde el punto de vista de la nutrición humana, en la carne de corderos alimentados en pasto o con fuentes ricas en n-3, como puede ser la semilla de lino.

**Tabla 1.** Relaciones de ácidos grasos de interés para la salud humana en la grasa intramuscular de corderos procedentes de diferentes sistemas de producción (Díaz et al., 2005).

	España	Alemania	Reino Unido	Uruguay (cordero ligero)	Uruguay (cordero pesado)	EEM <sup>(1)</sup>	Sign. <sup>(2)</sup>
P/S	0,38 <sup>a</sup>	0,20 <sup>c</sup>	0,19 <sup>c</sup>	0,31 <sup>b</sup>	0,21 <sup>c</sup>	0,08	***
P/S2	0,55 <sup>a</sup>	0,33 <sup>b</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,48 <sup>a</sup>	0,34 <sup>b</sup>	0,12	***
n-6/n-3	8,42 <sup>a</sup>	2,47 <sup>b</sup>	1,54 <sup>bc</sup>	1,36 <sup>bc</sup>	1,07 <sup>c</sup>	1,51	***
C18:2/C18:3	19,68 <sup>a</sup>	3,75 <sup>b</sup>	2,91 <sup>b</sup>	1,85 <sup>b</sup>	1,34 <sup>b</sup>	3,66	***

<sup>(1)</sup> EEM: error estándar de la media

<sup>(2)</sup> Nivel de significación; \*\*\*,  $p \geq 0,001$

<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre las medias de mínimos cuadrados ( $p < 0,05$ )

P/S: PUFA/SFA; P/S2: PUFA/(SFA – C18:0); n-6/n-3: (C18:2 + C20:3 + C20:4)/(C18:3 + C20:5 + C22:5 + C22:6)

En cambio, la relación PUFA/SFA está más influenciada por factores genéticos, como la raza, y por el sexo que originan diferencias en el nivel de engrasamiento del animal (Raes et al., 2004).

## 2.2. Modificación del perfil lipídico de la carne de rumiantes

La carne de cordero, debido a su elevada proporción de SFA y a su bajo contenido en ácidos grasos n-3, está cuestionada desde el punto de vista de la salud humana por la relación entre un alto contenido en SFA en la dieta y la mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares, así como con algunos tipos de cáncer (Williams, 2000). Por ello existe un gran interés en la manipulación del perfil de ácidos grasos de esta carne, con el fin de reducir los SFA y aumentar los PUFA, en especial los pertenecientes a la familia n-3 como son el ALA, el EPA y el DHA, mejorando de esa manera sus características nutritivas, con el beneficio que para la salud humana conlleva (Williams y Burdge, 2006).

Se puede incrementar el contenido en ácidos grasos n-3 de la carne mediante estrategias nutricionales, alimentando a los animales con dietas a base de pastos, o bien con concentrados suplementados con fuentes ricas en ácidos grasos n-3 (Wood et al., 2008). Por otro lado, una de las estrategias más efectivas para incrementar el valor nutricional de los productos y derivados cárnicos es la sustitución total o parcial de las grasas saturadas animales por otras fuentes de grasas insaturadas más saludables. Así la adición directa de lípidos naturales o procesados de plantas (aceituna, soja, semilla de algodón) y lípidos marinos (aceite de pescado y algas) durante la formulación de los productos cárnicos ha sido ampliamente investigadas (Jiménez-Colmenero, 2007).

### 2.2.1. Estrategias alimentarias en rumiantes

Gran número de estudios han puesto de manifiesto que la suplementación con PUFA en la dieta de los animales produce un aumento de los mismos en los tejidos (músculo y grasa), en varias especies de animales monogástricos como en cerdos (Muriel, Ruiz, Ventanas y Antequera, 2002) y pollos (Ponte et al., 2008). Independientemente del proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos que tiene lugar en el rumen, también se ha demostrado que es posible incrementar el contenido en PUFA n-3 en los tejidos de los rumiantes a través de la alimentación, incorporando fuentes ricas de PUFA n-3 (Scollan, Choi, Kurk, Fisher, Enser y Wood, 2001; Diaz et al., 2011).

El éxito de esta incorporación dependerá del tipo de ración suministrada, de la duración del periodo de alimentación y de las fuentes de lípidos ricos en PUFA que se incorporen en la dieta (Pérez, 2010).

Como se ha señalado anteriormente, el pasto en general contiene un elevado contenido en ALA, con posibles variaciones dependiendo de la madurez y de la variedad de las plantas que lo componen, por lo que se ha comprobado que su inclusión en la dieta de los rumiantes aumenta su deposición en el músculo y en el tejido adiposo de manera lineal a la duración de esta alimentación (Noci, Monahan, French y Moloney, 2005). En el estudio de French, Stanton, Lawless, O'Riordan, Monahan, Caffrey y Monoley (2000) en el que comparaban animales alimentados con concentrados, con silo y con diferentes cantidades de pasto, observaron que una elevada ingestión de pasto resulta en una relación PUFA/SFA mayor y n-6/n-3 menor de la grasa intramuscular, y un mayor contenido en CLA. Estos autores concluyeron que el perfil en ácidos grasos de la grasa

intramuscular puede ser mejorado desde el punto de vista nutritivo mediante la inclusión de pasto en la dieta. Además, se ha demostrado que la cría de ganado vacuno u ovino en un sistema basado en pasto está a menudo asociado a una disminución en los niveles de C16:0 y SFA totales y un aumento de C18:1 comparado con dietas ricas en concentrado (Shingfield, Bonnet y Scollan, 2013).

Otra estrategia para incrementar el contenido de PUFA n-3 es incluir en el pienso aceites o semillas de plantas ricas en estos ácidos grasos, así por ejemplo se ha empleado el girasol (Chang, Lunt y Smith, 1992), derivados de la soja (Rule y Beitz, 1986), el lino (Bas, Berthelot, Pottier y Normand, 2007; Raes et al., 2003; Díaz et al., 2011) o de la camelina (Moloney, Kennedy, Noci, Monahan y Kerry, 2012; Cieslak, Stanis, Wojtowski, Pers-Kamczyc, Szczechowiak, El-Sherbiny y Szumacher-Straber, 2013).

Varios estudios han demostrado que la semilla de lino, con un alto contenido en PUFA n-3, principalmente ALA, al incluirla en las dietas de rumiantes, puede aumentar la concentración de ALA en el músculo (Scollan, Hocquette, Nuernberg, Dannenberger, Richardson y Maloney, 2006; Bas et al., 2007; Diaz et al., 2011). En el estudio de Bas et al. (2007) observaron que los niveles de ALA en la carne aumentaban de manera proporcional al contenido de semillas de lino incluidas en la dieta de corderos (0, 3, 6 y 9 % de lino extrusado). Además observaron que el ALA podía ser transformado por elongación en PUFA LCh, aunque la eficacia de esta elongación fue bastante baja.

Por otro lado, la camelina (*Camelina sativa* L.), cultivo oleaginoso de la familia de las Brassicaceae, contiene también una elevada proporción de ALA, lo que hace que sea una fuente de PUFA n-3 alternativa a la semilla de lino. Así en estudios recientes, Cieslak et al. (2013), que han incluido esta planta, más concretamente la torta de camelina al 10% y al 20%, en la alimentación de corderos, han observado un aumento en los niveles de LA, ALA y CLA, y una disminución de la relación n-6/n-3 en la carne. Sin embargo, el uso de estas fuentes provenientes de plantas no produce un incremento significativo en el contenido de PUFA LCh en los tejidos, por lo que se han utilizado otras fuentes de origen marino como aceite o derivados del pescado, y algas, que presentan un mayor contenido en LCh n-3. En ese sentido Elmore, Mottram, Enser y Wood (2000) observaron que cuando se usaban como suplementos semilla de lino o

aceite de pescado en corderos, se producía un incremento en los niveles de PUFA n-3 en la carne, pero que solamente el aceite de pescado producía un incremento en EPA y DHA de dos a cuatro veces mayor que la semilla de lino.

Otros autores han encontrado que en corderos suplementados con harina (9% de la materia seca – MS) o con aceite de pescado (al 1,5%), se incrementaba la cantidad de EPA y DHA en la carne de dos a cuatro veces con respecto a un grupo al que se le administraba cebada (Ponnampalam, Sinclair, Egan, Blakeley, Li y Leury, 2001; Ponnampalam, Sinclair, Hosking y Egan, 2002). Además, estos autores no encontraron diferencias en la deposición de EPA y DHA entre la dieta suplementada con harina de pescado o la suplementada con aceite de pescado. Kitesa, Gulati, Ashes, Dcott y Fleck (2001), también obtuvieron un incremento en la cantidad de EPA y DHA en la carne de cordero suplementada con aceite de atún protegido (al 10% de la MS) frente a la degradación ruminal comparado con animales suplementados con sebo. Más recientemente, Díaz et al. (2011) utilizando aceite de pescado al 3,3% en la dieta de corderos ligeros, consiguieron concentraciones de 170 mg por 100 g de carne de PUFA LCh, cantidad que representa un 34% del consumo diario recomendado de estos ácidos grasos (EFSA, 2010), mientras que los animales del grupo control que no recibieron ningún suplemento rico en n-3 tuvieron concentraciones de 25 mg/100 g de músculo, lo que representa únicamente el 5% del consumo diario recomendado de PUFA LCh.

En los últimos años se están realizando estudios con algas marinas, para enriquecimiento de diferentes productos animales, como huevos, leche y carne con PUFA LCh, ya que es una fuente más sostenible que el aceite de pescado, al poderse cultivar a gran escala en fotobiorreactores (Rymer, Gibbs y Givens, 2010). En el caso del cordero, estudios recientes han demostrado que es posible aumentar los PUFA LCh de su carne mediante la suplementación de su dieta con algas marinas. Así Meale, Chaves, He y McAllister (2014) han encontrado que la concentración de DPA y DHA de los tejidos aumenta linealmente con la proporción de alga (*Schizochytrium* spp, microalga marina rica en DHA) incluida en la dieta de los corderos (0, 1, 2 y 3% de la MS). En un estudio similar, Diaz, Pérez, Sánchez, Lauzurica, Cañeque, González y De la Fuente (2017) observaron que con la suplementación de la dieta de corderos ligeros al 2% con alga marina, el contenido en EPA+DHA fue de alrededor de 112 mg por una porción de 135 g de carne (cantidad considerada como una ración normal de carne),

mientras que los animales del lote control tuvieron 10 mg por 135 g, lo que representan alrededor del 22% y el 2% respectivamente del consumo diario recomendado (EFSA, 2010). Además observaron que con la suplementación del alga al 2%, la relación n-6/n-3 disminuía de 9,01 a valores más acordes con las recomendaciones nutricionales (<4) (Department of Health, 2004).

### 2.2.2. Adición directa en carne y producto cárnicos

Así mismo, se puede incrementar el contenido en ácidos grasos n-3 modificando la fracción lipídica durante la formulación del producto cárnico, de manera que la grasa animal es total o parcialmente sustituida por otra grasa con una composición en ácidos grasos más saludable. Así, por ejemplo, como sustitutos de la grasa animal se han empleado aceites vegetales y plantas ricas en ácidos grasos n-3, como nueces, lino, cacahuete, girasol alto oleico, etc., y productos de origen marino como aceites de pescado y algas (Jimenez-Colmenero, Carballo y Cofrades, 2001). No obstante, el producto resultante puede mostrar algunas diferencias con respecto al producto tradicional dependiendo de la grasa utilizada, especialmente si nos referimos a las características sensoriales, aunque estas diferencias pueden ser enmascaradas por las especias utilizadas en la fabricación del producto (Díaz, Rivas-Cañedo, De la Fuente, Pérez y Lauzurica, 2013).

El tipo de material utilizado va a influenciar en gran medida el perfil en ácidos grasos del producto resultante y, como se ha señalado anteriormente, a las características sensoriales del mismo. En el estudio de Bilek y Turhan, (2009), estudiaron la incorporación de harina de lino al 3, 6, 9, 12 y 15% en la formulación de hamburguesas de vacuno, y encontraron que se incrementaba progresivamente el contenido en PUFA, principalmente ALA, y la relación PUFA/SFA, y decrecía la relación n-6/n-3 hasta alcanzar valores considerados óptimos nutricionalmente hablando. No obstante, las puntuaciones sensoriales eran peores en las hamburguesas a las que se incorporaba más de un 6% de harina de lino en su formulación.

Por otro lado, Valencia, Ansorena y Astiasarán (2006) realizaron una sustitución parcial (25%) de grasa de cerdo por aceite de pescado para la fabricación de chorizo, lo que dio lugar a un incremento en el contenido de EPA y DHA de 6.300 y 4.500% respectivamente, mientras que cuando se ha utilizado un aceite procedente de algas en

el mismo tipo de producto se obtuvieron incrementos en el contenido de EPA y DHA de 433 y 5.060% (Valencia, Ansorena y Astiasarán, 2007). Sin embargo, en el estudio de Valencia et al. (2006) algunos panelistas detectaron sabor a pescado en los chorizos a los que se había incorporado el aceite de pescado, aunque este hecho no afectó a la aceptabilidad global de los mismos. En el caso del estudio con aceite de algas, los panelistas eran capaces de diferenciar los chorizos control de los que contenían el aceite de alga cuando éste se incorporaba al 25%, concluyendo que no eran viables desde el punto de vista sensorial, pero que si se incluía al 15% no se observaba este problema.

La utilización de aceites ricos en PUFA n-3 en los productos cárnicos puede perjudicar a importantes atributos sensoriales y tecnológicos, además puede reducir la vida útil del producto debido al aumento de la oxidación lipídica. Por ello se ha encontrado que la microencapsulación, que consiste básicamente en la producción de micropartículas mediante el recubrimiento con agentes microencapsulantes como, por ejemplo alginato, es una técnica efectiva para incrementar la estabilidad oxidativa y para prevenir la degradación térmica de los PUFA n-3 de estos aceites (Ruiz, De la Luz y Segura, 2015). Recientemente, Heck et al. (2017) utilizaron aceite de chia y de lino microencapsulados, sustituyendo al 50% la grasa de cerdo, para la producción de hamburguesas más saludables, con resultados favorables ya que la sustitución no afectó a la dureza de las hamburguesas y mejoró propiedades tecnológicas importantes como las pérdidas por cocinado y la retención de grasa, además la reformulación dio lugar a unas relaciones PUFA/SFA y n-6/n-3 más saludables. No obstante cuando se utilizaron los microencapsulados de aceite de chia las hamburguesas mostraron una mayor oxidación lipídica y una menor calidad sensorial, problema que no se observó con los microencapsulados de aceite de lino.

### 2.3. Procesos oxidativos en la carne y producto cárnico.

Los procesos oxidativos son la principal causa del deterioro de la calidad durante el procesado y la conservación de la carne. La susceptibilidad de la carne a la oxidación se debe a la presencia de un alto contenido en PUFA, de pigmentos hemínicos, de metales de transición, así como a la presencias de otros agentes oxidantes en los tejidos, como las enzimas peroxidasa. La pérdida de calidad en la carne como consecuencia de los fenómenos de oxidación se caracteriza por un deterioro organoléptico, por una disminución del valor nutricional y por la posible formación de compuestos tóxicos (Kanner, 1994).

La oxidación lipídica es una de las principales causas del deterioro funcional, sensorial y nutricional de la carne y derivados cárnicos durante su procesado y conservación (Morrisey, Sheehy, Galvin, Kerry y Buckley, 1998). Este fenómeno tiene lugar por medio de un proceso químico llamado autooxidación, que se define como la reacción espontánea de los lípidos con el oxígeno atmosférico a través de una reacción en cadena mediada por radicales libres (Shadidi y Zhong, 2010). Este proceso afecta principalmente a los PUFA, ya que son altamente susceptibles a la oxidación (Porter, 1995). La autooxidación se inicia en los fosfolípidos de las membranas celulares y subcelulares que están en contacto con los compuestos celulares oxidantes y con las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas en las mitocondrias (Frankel, 2005). El proceso de autooxidación consta de una serie de fases: iniciación, propagación y terminación; que se desarrollan de forma simultánea (Frankel, 2005; Shadidi y Zhong, 2010).

La fase de iniciación tiene lugar mediante la sustracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado (LH) en presencia de iniciadores ( $R^\bullet$ ), dando lugar a la formación de un radical lipídico alquilo ( $L^\bullet$ ) (Reacción 1). Debido a que la formación espontánea de un radical lipídico ( $L^\bullet$ ) es un proceso termodinámicamente desfavorecido (Gray et al., 1996), es necesaria la participación de agentes iniciadores ( $R^\bullet$ ) (Shadidi y Zhong, 2010) entre los que se encuentran las ROS, como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) o radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los metales de transición (Halliwell, 2006). Este proceso afecta principalmente a los PUFA porque la pérdida de un átomo de hidrógeno en un carbono cercano a un doble enlace tiene lugar más

fácilmente al presentar menor energía de enlace hidrógeno-carbono (H-C) y, por tanto, estar más débilmente unido a la cadena hidrocarbonada (Schaefer et al., 2000). Esto explica por qué los fosfolípidos que contienen una gran cantidad de estos ácidos grasos son los principales sustratos de la oxidación lipídica en la carne.



La fase de propagación comienza con la reacción entre el radical lipídico ( $\text{L}^\bullet$ ) formado en la fase de iniciación con el oxígeno molecular para formar un radical peroxilo ( $\text{LOO}^\bullet$ ) (Reacción 2) el cual secuestra un átomo de hidrógeno de otra cadena hidrocarbonada de un ácido graso intacto (LH), originando hidroperóxidos (LOOH). De esta forma se generan nuevos radicales lipídicos (Reacción 3), propagándose así la reacción en cadena (Frankel, 2005). Durante esta fase, los hidroperóxidos (LOOH) se producen como productos primarios de la oxidación. Sin embargo, estos compuestos son muy inestables y se rompen en una gran variedad de productos secundarios de la oxidación, como aldehídos, cetonas, alcoholes y ácidos orgánicos volátiles que van a ser los responsables de los olores y sabores desagradables en carnes con alto grado de oxidación (Campo, Nute, Hughes, Enser, Wood y Richardson, 2006). Como consecuencia de la descomposición de los hidroperóxidos se forman más especies lipídicas reactivas, como el radical alcoxilo ( $\text{LO}^\bullet$ ), hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), peroxilo ( $\text{LOO}^\bullet$ ) y lipídico ( $\text{L}^\bullet$ ), que se incorporan a la fase de propagación (Shadidi y Zhong, 2010).



En la fase de terminación los radicales interaccionan entre ellos y se neutralizan al combinarse y dar un producto no radical estable (LOOL). Generalmente los radicales que se combinan son radicales peroxilo (Reacción 4) (Frankel, 2005).



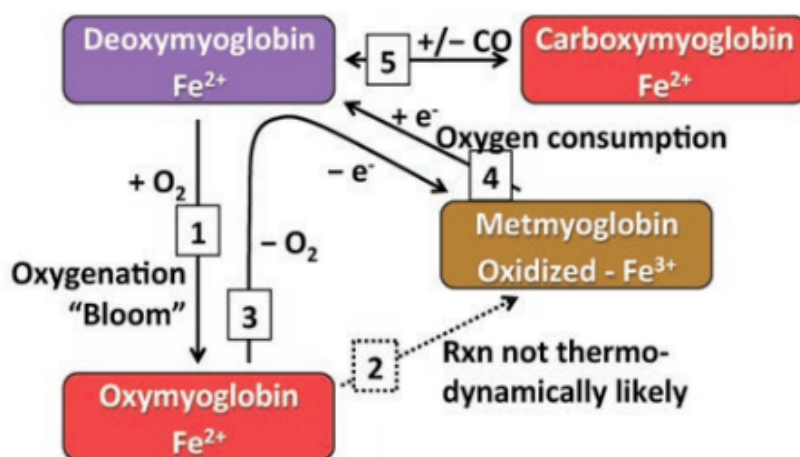
La oxidación lipídica, por lo tanto, va a afectar a la calidad de la carne y sus derivados, provocando una pérdida del valor nutritivo, al disminuir el contenido en PUFA (principalmente PUFA LCh), y una disminución de la calidad organoléptica por un deterioro del aroma y el sabor, lo que produce en algunos casos el rechazo de la carne por parte del consumidor (Ganesan, Brothersen y McMahon, 2014). Además, algunos

de los productos derivados de la oxidación lipídica se han relacionado con citotoxicidad, aterogénesis, mutagénesis y carcinogénesis (Schroepfer, 2000; Guardiola, Conody, Addis, Rafecas y Botella, 1996; Maraschiello, García-Regueiro y Sárraga, 1997), pudiendo afectar a la seguridad del alimento.

El color es, sobre todas las cualidades, la principal en la que los consumidores basan su elección en el momento de la compra, ya que es el primer atributo de calidad que pueden apreciar y lo van a relacionar con la frescura del producto (Mancini y Hunt, 2005). En el punto de compra, el consumidor demanda un producto con una apariencia que cumpla sus expectativas, como es un color rojo en la carne, y aquellos productos que no las cumplan serán rechazos por creer que se pierde en frescura y calidad organoléptica (Carpenter, Cornforth y Whittier, 2001).

El color de la carne depende del pigmento mioglobina (Mb), que es el principal responsable de la diferente coloración según su forma química. La Mb es una metalproteína hemínica constituida por una parte proteica (globina) y un grupo prostético de naturaleza no peptídica (hemo). En el centro del grupo hemo, la Mb tiene un átomo de hierro con 6 sitios de coordinación, de los cuales el sexto puede unirse reversiblemente a diferentes ligandos, de tal forma que el estado oxidativo de este átomo de hierro y el tipo de ligando presente en la posición 6ª, van a determinar el color de la carne (Figura 2) (AMSA, 2012; Mancini y Hunt, 2005; Suman y Joseph, 2013). La deoximioglobina (DeoxiMb) presenta un color violáceo y no tiene ningún ligando unido en la sexta posición al hierro, el cual se encuentra en su forma reducida ( $Fe^{2+}$ ). Este pigmento es típico de la carne recién cortada y de la envasada al vacío. Cuando la mioglobina se expone al oxígeno, se forma la oximioglobina (OxiMb) que presenta su grupo hemo en estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) y una molécula de oxígeno ( $O_2$ ) unida al hierro. Este pigmento aporta el característico color rojo a la carne fresca y a la carne envasada con alta proporción de oxígeno. El proceso por el cual la carne pasa del color violáceo de la DeoxiMb al color rojo de la OxiMb se conoce como oxigenación de la Mb o *blooming* y se mantiene durante más tiempo si la carne tiene acceso al oxígeno, como por ejemplo en carne envasada en atmósfera protectora con alta proporción de oxígeno (HiOx-MAP) (McMillin, 2008). La carboximioglobina se forma al unirse el hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) con monóxido de carbono (CO) aportando también un color rojo a la carne en un ambiente

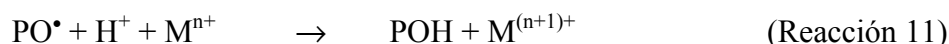
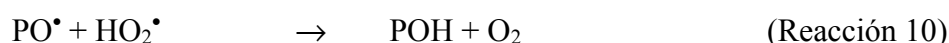
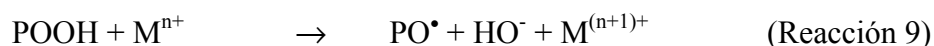
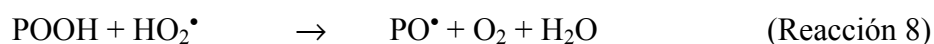
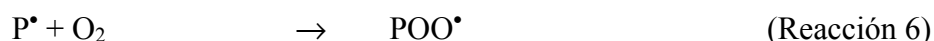
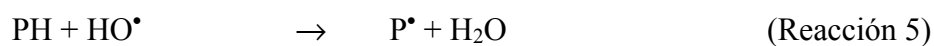
sin oxígeno. La decoloración de la carne tiene lugar por la oxidación del hierro de su estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a su estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), dando lugar a la formación de metamioglobina (MetMb) que otorga una tonalidad parduzca a la carne y tiene una molécula de agua unida al hierro en el 6° sitio de coordinación, por lo que queda bloqueado para el acceso al oxígeno. La MetMb se forma por la oxidación de la DeoxiMb mediada por ROS cuando el contenido en oxígeno no es suficiente para mantenerla en estado oxigenado, es decir, en forma de OxiMb (AMSA, 2012). En este sentido, aquella carne que presente un 20% de MetMb va a ser discriminada por el consumidor (MacDougall, 1982) y aquella que supere el 40% de MetMb será directamente rechazada (Greene, Hsin y Zipser, 1971).



**Figura 2.** Esquema de las interrelaciones de los distintos estados de oxidación-reducción de la mioglobina en carne. Fuente: AMSA (2012)

Otra de las biomoléculas de la carne que sufren alteración por los procesos oxidativos son las proteínas. Los compuestos radicales reaccionan con las proteínas y los péptidos en presencia de oxígeno dando lugar a alteraciones en el esqueleto proteico/peptídico, así como en los aminoácidos de las cadenas laterales. La oxidación de las proteínas tiene lugar a través de una reacción en cadena similar a la que tiene lugar durante la autooxidación de los lípidos (Xiong, 2000). La sustracción de un átomo de hidrógeno de una estructura proteica (PH) da lugar a un radical proteico ( $\text{P}^\bullet$ ) (Reacción 5). Este  $\text{P}^\bullet$  se convierte en un radical peroxilo ( $\text{POO}^\bullet$ ) en presencia de oxígeno (Reacción 6) el cual

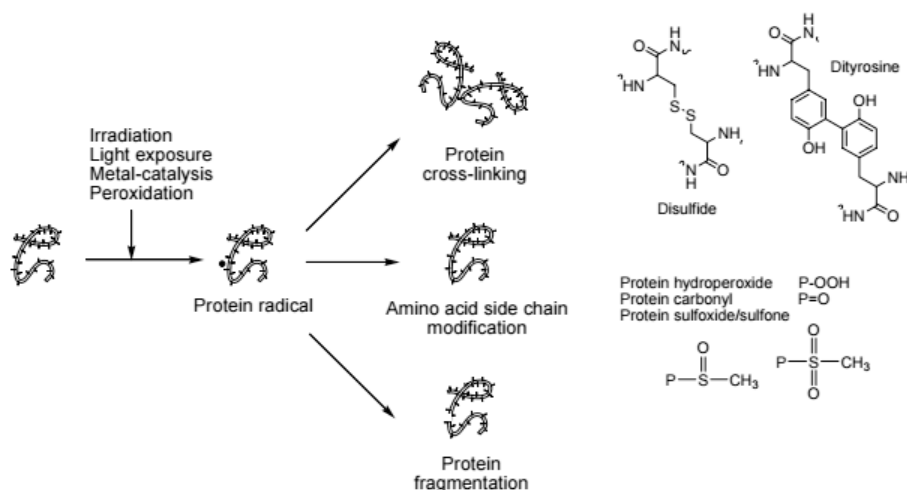
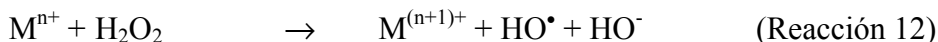
puede extraer de nuevo otro átomo de hidrógeno de una molécula susceptible y formar hidroperóxidos (POOH) (Reacción 7). Reacciones posteriores con ROS, como el radical perhidroxilo ( $\text{OH}_2^\bullet$ ) o metales en su forma reducida ( $\text{M}^{n+}$ ), originan radicales alcoxilo ( $\text{PO}^\bullet$ ) (Reacciones 8 y 9) y sus derivados hidroxilo (POH) (Reacciones 10 y 11) (Estévez, 2011).



Estos procesos oxidativos en las proteínas va a dar lugar a cambios en su estructura, que incluyen formación de entrecruzamientos, modificación en determinados aminoácidos de las cadenas laterales y fragmentación de la cadena peptídica (Figura 3) (Lund, Heinonen, Baron y Estévez, 2011).

La formación de entrecruzamientos en las proteínas musculares pueden ocurrir dentro de una misma molécula o entre moléculas distintas y conlleva la unión de productos de la oxidación y una posterior polimerización de las proteínas. En los sistemas cárnicos, el entrecruzamiento más relevante tiene lugar entre los grupos tiol de dos aminoácidos cisteína dando lugar a enlaces covalentes disulfuro (Lund et al., 2011). Una de las principales modificaciones en los aminoácidos de las proteínas es la formación de grupos carbonilo. Se trata de una reacción irreversible debida a una oxidación directa de las cadenas laterales de los aminoácidos lisina, treonina, arginina y prolina. La formación de grupos carbonilo se atribuye generalmente a una oxidación mediada por metales, en presencia de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a través de la reacción de Fenton (Reacción 12) que da lugar a especies reactivas en las inmediaciones de los aminoácidos susceptibles a la oxidación (Estévez, 2011). Otra manifestación de la

oxidación de las proteínas es la fragmentación de la cadena peptídica como consecuencia de la reacción de radicales libres en posiciones específicas del esqueleto proteico (Soladoye, Juárez, Aalhus, Shand y Estévez, 2015).



**Figura 3.** Modificaciones de la estructura proteica causadas por la oxidación. Fuente: Lund et al. (2011).

Estas modificaciones estructurales de las proteínas dan lugar a una pérdida de la calidad y el valor nutritivo de la carne. La formación de grupos carbonilo y la aparición de entrecruzamientos inter e intramoleculares se han identificado como las modificaciones que más influyen en la pérdida de funcionalidad de las proteínas, así como en la alteración del color, textura y sabor de la carne y productos cárnicos (Estévez, 2011). Además de estos efectos en la calidad de la carne, más recientemente se ha estudiado la posible repercusión de la oxidación proteica en la biodisponibilidad y digestibilidad, así como en los posibles efectos perjudiciales en la salud humana (Soladoye et al., 2015). En este sentido, la formación de grupos carbonilo es un proceso irreversible, con lo que va a limitar la accesibilidad a aminoácidos esenciales como son la lisina, la treonina y la arginina. En cuanto a la digestibilidad, no está del todo identificado cuánto y cómo influye la oxidación de las proteínas cárnicas en su digestión *in vivo*, pero los estudios *in vitro* apuntan hacia una modificación de los sitios específicos de unión de las proteínas con las enzimas digestivas, en parte provocado por procesos de polimerización y agregación (Morzel, Gatellier, Sayd, Rennerre y Laville, 2006). Por lo

tanto, al reducir la cantidad de aminoácidos esenciales disponibles y la actividad de las enzimas digestivas sobre las proteínas, la biodisponibilidad de estas moléculas se ve comprometida. Queda por esclarecer aún el posible efecto perjudicial en la salud tras la ingesta de aminoácidos y proteínas oxidadas y su relación con un aumento del riesgo de sufrir enfermedades relacionadas con un mal funcionamiento proteico (Soladoye et al., 2015).

El inicio y progreso de los fenómenos oxidativos explicados van a estar interrelacionados, de forma que las especies radicales generadas en cada tipo de los procesos van a afectar y promover el resto. Estas relaciones se han estudiado mayoritariamente *in vitro* y la dirección en la que tienen lugar depende del sistema utilizado para el estudio, como por ejemplo de los iniciadores de la oxidación empleados (hierro hemo o no hemo, presencia de ROS o compuestos prooxidantes no radicalarios...) y del sistema oxidante del medio (PUFA o MetMb). La relación entre la oxidación lipídica y la oxidación de la Mb ha sido revisada por Faustman, Sun, Mancini y Suman (2010). Los estudios en sistemas modelos indican que los productos de la oxidación de ambos procesos son capaces de iniciar la oxidación de forma recíproca, aunque en los estudios con carne y derivados cárnicos estos procesos oxidativos no siempre están relacionados (Faustman et al., 2010). En sistemas *in vitro* cárnicos se ha visto que la oxidación de las proteínas miofibrilares está más afectada por la presencia de ROS que por la presencia de PUFA o MetMb en el medio de ensayo (Park, Xiong, Alderton y Ooizumi, 2006). La oxidación proteica y su interrelación con la oxidación lipídica y la oxidación de la Mb está aun bajo estudio, pero los resultados *in vitro* indican que las especies reactivas de la Mb afectan más que los radicales lipídicos (Lund et al., 2011). En este sentido, se ha observado que la oxidación lipídica es patente cuando el color todavía puede ser aceptable (Mancini y Hunt, 2005) y cuando los productos de la oxidación proteica aún están empezando a formarse (Estévez, Kylli, Puolanne, Kivikari y Heinonen, 2008).

### 2.3.1. Influencia del contenido en ácidos grasos omega-3.

Como se ha comentado, el incremento del contenido de PUFA n-3 en la carne mediante estrategias nutricionales o mediante su adición en los productos cárnicos, hace que aumenten los procesos oxidativos en los mismos como consecuencia de la

autooxidación lipídica, afectando a la calidad organoléptica del producto y, en mayor o menor medida, a la estabilidad de las proteínas y del color.

En el estudio de Díaz et al. (2011) en el que se aportaron fuentes ricas en PUFA n-3 (lino extrusado, aceite de pescado y algas) para aumentar la proporción de n-3 en el músculo de corderos, se observó que los PUFA LCh disminuyeron alrededor de un 15% tras 7 días de almacenamiento en refrigeración, debido a los procesos oxidativos, y que los corderos que recibieron aceite de pescado tuvieron mayores puntuaciones de olor y sabor a pescado y a rancio.

De modo similar, Nute et al., (2007) también observaron una pérdida de la calidad organoléptica de la carne cuando está enriquecida con PUFA. Estos autores suplementaron la dieta de corderos con aceite de lino o con aceite de pescado, dando lugar a una carne con elevada proporción de ALA o de DHA, respectivamente, lo cual originó una carne con diferente grado de oxidación y con diferente calidad organoléptica. Así, la carne rica en ALA presentó valores de oxidación lipídica menores que la carne rica en DHA lo que llevó a una puntuación del sabor a cordero mayor y una puntuación del sabor a pescado menor, en la carne enriquecida con ALA en comparación con la carne con alto contenido en DHA. El sabor a pescado en los productos enriquecidos con PUFA n-3 se relaciona con la formación de productos derivados de la oxidación, como son los aldehídos y las cetonas, que en el caso de carne con alto contenido en DHA (varios dobles enlaces) será mayor (Ganesan, Brothersen y McMahon, 2014). Por lo tanto, la presencia de PUFA pero también el tipo de PUFA, va a tener gran influencia en el estado oxidativo de la carne. Además de una pérdida de la calidad sensorial, Nute et al. (2007) observaron también que una mayor intensidad de la oxidación lipídica estuvo relacionada con una mayor decoloración de la carne.

Por el contrario, otros autores no han encontrado una influencia del contenido de PUFA n-3 en la carne con los procesos oxidativos. Así por ejemplo, en el estudio de Gatellier, Kondjoyan, Portanguen y Santé-Lhoutellier (2010), la incorporación de PUFA en carne de bovino a través de la alimentación (4,6% de lino y 8,4% de colza) no presentó ningún efecto en la oxidación proteica tras el cocinado de la carne y tampoco se observaron diferencias en cuanto a la oxidación lipídica entre la carne enriquecida con PUFA y la carne control. Del mismo modo, Ponnampalam et al. (2012) indicaron que el

nivel de PUFA no juega un papel principal en el mantenimiento de la estabilidad del color, sino que depende en mayor medida del contenido en antioxidantes y de hierro de la carne.

La formulación de derivados cárnicos con fuentes de PUFA, ha dado lugar también a procesos oxidativos durante la conservación. Así, la elaboración de hamburguesas de cerdo con carne de animales alimentados con una dieta rica en PUFA (2% aceite de soja) incrementó los procesos de oxidación lipídica en la carne envasada en HiOx-MAP aunque la oxidación proteica no estuvo afectada (Lund, Hviid, Claudi-Magnussen y Skibsted, 2008). De forma parecida, Nieto, Martínez, Castillo y Ros (2017) estudiaron el enriquecimiento de salchichas de pollo con 20 g/100 g de aceite de oliva en la estabilidad oxidativa durante la conservación en HiOx-MAP y observaron un incremento de la oxidación lipídica pero la oxidación proteica no estuvo afectada. Estos autores encontraron diferencias en el color de las salchichas al incorporar los PUFA, sin embargo, en chorizos formulados con aceite de pescado (10,7 g/kg de producto) se observó igualmente una mayor oxidación lipídica pero, en este caso, no se encontraron diferencias en los parámetro instrumentales del color (Muguerza, Ansorena y Astiasarán, 2004).

Por lo tanto, queda patente que la incorporación de PUFA en la carne promueve los procesos oxidativos, afectando principalmente a la fracción lipídica. Por lo tanto, el empleo de antioxidantes se presenta como un factor fundamental para la estabilidad de carne y derivados cárnicos con un perfil lipídico más saludable.

### 2.4. Antioxidantes

Durante el procesado, distribución y conservación de los alimentos, el principal cambio que ocurre en el producto son los procesos oxidativos. Como se ha comentado anteriormente, la oxidación de los lípidos y los cambios que ello conlleva en otros componentes de los alimentos, van a afectar a la calidad nutricional, a la seguridad alimentaria y a los atributos sensoriales (como color, sabor y textura) de los alimentos. De modo que el principal fundamento del empleo de antioxidantes en la industria alimentaria es aumentar la vida útil de los productos reduciendo las pérdidas por deterioro y la pérdida de calidad nutricional, mediante la inhibición o reducción de los fenómenos de oxidación.

Un antioxidante se define como “cualquier sustancia que, a bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o previene de forma significativa la oxidación de dicho sustrato” (Halliwell, 1995). Este sustrato oxidable incluye lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Un antioxidante ideal debería de cumplir las siguientes propiedades (Coppen, 1983): (1) ser inocuo, esto es, de uso seguro en alimentación; (2) no afectar las propiedades organolépticas del producto variando el color, olor o sabor; (3) ser efectivo a bajas concentraciones; (4) ser fácil de incorporar al producto; (5) mantenerse estable durante el procesado y conservación del producto; (6) ser estable en el producto final y (7) estar disponible a bajo coste. Dentro de esta definición de antioxidante se incluyen sustancias que neutralizan los radicales libres, captan el oxígeno singlete, inactivan peróxidos y otras ROS, queladores de metales, captadores de productos secundarios de la oxidación e inhibidores de enzimas prooxidantes (Shahidi y Zhong, 2007).

La actividad de un antioxidante viene determinada por una serie de características (Rice-Evans, Miller y Paganga, 1997):

- la reactividad como agente donante de átomos de hidrógeno o electrones (lo que está relacionado con su potencial de reducción)
- la estabilidad del radical generado tras la reducción del antioxidante, esto es, su capacidad para estabilizar el electrón desapareado resultante
- la reactividad con otros antioxidantes y/o prooxidantes
- la capacidad para quelar metales de transición

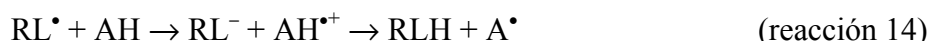
Los mecanismos de acción de un antioxidante incluyen (Kumar y Pandey, 2013; Shahidi y Naczki, 2004b):

- prevenir la formación de ROS y/o de especies reactivas del nitrógeno (RNS) mediante la inhibición de enzimas, o mediante la quelación de elementos que participan en la formación de radicales libres
- neutralizar ROS una vez formados para prevenir la fase de iniciación de los procesos oxidativos
- descomponer los productos primarios de oxidación evitando la fase de propagación de los procesos oxidativos
- proteger los sistemas de defensa antioxidante endógenos

Según estos mecanismos de acción, los antioxidantes se clasifican en antioxidantes preventivos, antioxidantes inactivadores (*scavenging antioxidants*) y antioxidantes reparadores (Niki, 2010). Los *antioxidantes preventivos* actúan en la primera línea de defensa del organismo y tradicionalmente se han clasificado como *antioxidantes secundarios* (Shahidi y Wanasundara, 1992). Estos antioxidantes evitan la formación o inactivan los promotores de los procesos oxidativos, como son las ROS, las RNS, el oxígeno singlete o las enzimas prooxidantes, al actuar como agentes reductores o agentes quelantes de metales. En esta primera línea de actuación se encontraría el ácido ascórbico (vitamina C) y las enzimas glutatión peroxidasa y catalasa que descomponen el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua. Los *antioxidantes inactivadores*, conocidos también como *antioxidantes primarios* (Shahidi y Wanasundara, 1992), captan, neutralizan o eliminan los radicales libres activos antes de que puedan atacar las moléculas biológicas, generando radicales más estables que no continúan los procesos oxidativos, y actúan como segunda línea de defensa *in vivo*. En este grupo se encontraría los tocoferoles y la enzima superóxido dismutasa que convierte el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en  $H_2O_2$ . Por último, los *antioxidantes reparadores* son la tercera línea de defensa y se trata de enzimas que reparan los daños celulares generados por los procesos oxidativos, eliminan los desechos y restituyen la funcionalidad.

Los antioxidantes inactivadores (AH), entre los que se encuentran los compuestos fenólicos y la vitamina E, captan o neutralizan los radicales libres ( $RL^{\bullet}$ ) donando un átomo de hidrógeno (reacción 13) o donando un electrón seguido de la cesión de un

átomo de hidrógeno (reacción 14) para dar lugar a un producto estable (RLH) y a un radical antioxidante ( $A^\bullet$ ) que será también estable y no propaga la reacción de oxidación. Algunos antioxidantes, como los carotenoides, neutralizan radicales libres mediante una reacción de adición al doble enlace que presentan en su molécula, de tal forma que los “capturan” dentro de su molécula (reacción 15) (Niki, 2010; Niki 2014).



Según su origen y fabricación, los antioxidantes pueden clasificarse como antioxidantes sintéticos y antioxidantes naturales. Los *antioxidantes sintéticos* más comunes son el butil-hidroxi-anisol (BHA) (E 320), el butil-hidroxi-tolueno (BHT) (E 321), el galato de propilo (PG) (E 310) y el terbutil-hidroquinona (TBHQ) (E 319) que se han empleado durante décadas como conservantes en la industria alimentaria ya que actúan forma eficaz, poco costosa y, además no aportan sabor a los alimentos (Shahidi y Zhong, 2015). Estos antioxidantes presentan uno (BHA y BHT), dos (TBHQ) o tres (PG) grupos hidroxilo (-OH) en su molécula, de modo que su actividad antioxidante la ejercen cediendo átomos de hidrógeno a los radicales libres, interrumpiendo la fase de propagación de los procesos oxidativos. Se trata de compuestos principalmente liposolubles (a excepción del PG que es anfipático), así que se han utilizado principalmente para estabilizar aceites vegetales, aceites esenciales, grasas animales y también productos cárnicos (Shahidi y Wanasundara, 1992). Sin embargo, estos compuestos han sido cuestionados en las últimas décadas por varios motivos. Por un lado, presentan varios inconvenientes como son la naturaleza volátil del BHA y el BHT que va a dar lugar a la aparición de olores en los productos, o el hecho de que el PG sea poco estable a altas temperaturas lo cual restringe su uso en productos que lleven un procesado a altas temperaturas, o que forme complejos con el hierro y el cobre que provoca el oscurecimiento de algunos productos (Shahidi y Wanasundara, 1992). Por otro lado, su uso está cuestionado desde el punto de vista de la seguridad alimentaria ya que diversos estudios han puesto de manifiesto el posible efecto perjudicial o tóxico para la salud tras el consumo de antioxidantes sintéticos, lo que ha llevado a las

autoridades y organismos sanitarios, como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), a revisar la bibliografía científica publicada y a establecer una ingesta diaria aceptable para estos compuestos que no comprometan la salud pública (Carocho, Barreiro, Morales y Ferreira, 2014; EFSA, 2011; EFSA, 2012; EFSA 2014). A pesar de que las investigaciones realizadas proporcionan resultados contradictorios y no está totalmente sustentando el efecto nocivo de los antioxidantes sintéticos, existe una gran demanda por parte del consumidor de productos libres de químicos a favor de aquellos de origen natural que, además, se asocian con un efecto potencialmente beneficioso en el organismo, más allá de su función como conservante en el alimento (Devcich, Pedersen y Petrie, 2007). Por este motivo, la industria alimentaria está cada vez más interesada en la búsqueda de conservantes naturales que satisfagan los requerimientos del consumidor. Los *antioxidantes naturales* son compuestos presentes en las plantas, algas y setas con capacidad de ceder átomos de hidrógeno o electrones, quelar metales y/o interrumpir la cadena de propagación de los procesos oxidativos. Dentro de estos antioxidantes, los más representativos son las vitaminas, como el ácido ascórbico (vitamina C) y la vitamina E, los compuestos polifenólicos y los carotenoides. Hay que tener en cuenta que algunos de estos compuestos son producidos sintéticamente siguiendo la estructura de los compuestos naturales, como es el caso de la vitamina C (E 300) y de los diferentes tipos de vitamina E (E 307, E 308 y E 309) que, a pesar de fabricarse químicamente, siguen teniendo la aceptación del consumidor (Carocho, Barreiro, Morales y Ferreira, 2014).

## **2.5. Compuestos fenólicos**

A lo largo principalmente de la última década, los compuestos fenólicos han tenido un interés creciente tanto desde el punto de vista de la industria alimentaria y de la comunidad científica, como desde el punto de vista del consumidor, por varias razones principales. Por un lado, diferentes estudios epidemiológicos han sugerido que el consumo de alimentos y bebidas con alto contenido en compuestos fenólicos presentan efectos beneficiosos frente a la incidencia de diversas patologías como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Este efecto se relaciona con su actividad antioxidante protegiendo los tejidos frente al estrés oxidativo. Por otro lado, los polifenoles son los compuestos antioxidantes más ampliamente distribuidos en los alimentos que componen la dieta humana (Scalbert y Williamson, 2000).

### **2.5.1. Origen y estructura de los compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos que se encuentran en los alimentos son el principal producto del metabolismo secundario de las plantas, que los sintetizan a partir del aminoácido fenilalanina y, en algunos casos, también a partir de la tirosina. Los compuestos fenólicos poseen una estructura química caracterizada por la presencia de unos o más anillos aromáticos (todos derivan de la estructura química del fenol ) con uno o varios grupos hidroxilos unidos. Estos compuestos son esenciales para las funciones fisiológicas de los vegetales, ya que participan en el crecimiento y reproducción, y actúan también en funciones defensivas al poseer propiedades antinutricionales, pesticidas y antibióticas, proporcionando protección frente a depredadores y patógenos. Los compuesto fenólicos son ampliamente conocidos por participar en la pigmentación de los vegetales y protegen de las radiaciones ultravioleta, además de atraer polinizadores y presentar funciones estructurales (Shahidi y Naczk, 2004a).

La estructura química de los polifenoles va a determinar sus propiedades biológicas, incluyendo la biodisponibilidad, la capacidad y actividad antioxidante, las posibles interacciones con receptores de membrana y/o enzimas en los tejidos y otras diversas propiedades (Scalbert y Williamson, 2000).

Los compuestos fenólicos se clasifican en diferentes grupos en función del número de anillos aromáticos que presentan y de los elementos estructurales que presentan estos

anillos. Las principales clases de compuestos fenólicos son: ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos y lignanos (D'Arvichio, Filesi, Di Benedetto, Gargiulo, Giovannini y Masella, 2007; Manach, Scalbert, Morand, Rémésy y Jiménez, 2004; Scalbert y Williamson, 2000; Tsao, 2010). Los compuestos fenólicos en los alimentos se encuentran generalmente asociados con carbohidratos, ácidos orgánicos o entre ellos formando polímeros.

Los ácidos fenólicos se clasifican en dos grupos, en función de si derivan del ácido benzoico o del ácido cinámico. Los *ácidos hidroxibenzoicos* presentan un grupo carboxilo (-COOH) y uno o varios grupos hidroxilo (-OH) en el anillo aromático. Ejemplos de ácidos hidroxibenzoicos son el ácido protocatéquico, el ácido vainílico y el ácido gálico. Estos compuestos fenólicos se encuentran en pocos vegetales de consumo humano, entre los que se encuentran los frutos rojos, los rábanos, las cebollas y el té. Los *ácidos hidroxicinámicos* presentan el grupo -CH=CH-COOH en el lugar del grupo carboxilo de los ácidos hidroxibenzoicos. Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes y se encuentran en un mayor número de alimentos, principalmente en frutas (arándanos, manzanas, kiwis, cerezas, ciruelas), en el café y en cereales. En este grupo destacan el ácido p-cumárico, el ácido cafeico, el ácido ferúlico, el ácido sináptico y el ácido clorogénico (que está formado por el ácido cafeico esterificado con el ácido quínico). Los ácidos fenólicos pueden encontrarse en forma libre en los alimentos, pero generalmente se van a encontrar esterificados con otros ácidos o con carbohidratos.

Los alcoholes fenólicos presentan una estructura simple, al igual que los ácidos fenólicos, formada por un solo anillo aromático. Los principales alcoholes fenólicos son el tirosol y el hidroxitirosol que se encuentran principalmente en el aceite de oliva virgen extra, aunque el tirosol aparece también en los vinos tintos y blancos, así como en la cerveza. El hidroxitirosol puede encontrarse también en el vino tinto.

Los flavonoides son los compuestos fenólicos predominantes en el reino vegetal, abarcando cerca de dos tercios de los fenoles de la dieta. Comparten un esqueleto común difenilpirano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) formado por dos anillos aromáticos hidroxilados (anillo A y anillo B) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono que generalmente se cicla formando un anillo pirano (anillo C). Los flavonoides se encuentran en las plantas principalmente como glucósidos ligados a moléculas de

carbohidratos, aunque pueden aparecer también en forma libre, recibiendo el nombre de agliconas flavonoides. El principal glúcido unido a los flavonoides es la glucosa, seguido de galactosa, rramnosa, xilosa y arabinosa. La unión del carbohidrato a la molécula de flavonoide puede tener lugar a través de un grupo hidroxilo (O-glucósidos) o por medio de un enlace carbono-carbono (C-glucósidos) y los sitios de unión más comunes son en la posición 3 y 7. Dependiendo del nivel de oxidación del anillo C y de la posición del anillo B, los flavonoides se subdividen en varias clases: chalconas, flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanonoles, isoflavonas, neoflavonoides, flavan-3-ol y antocianidinas.

Las *chalconas* se caracterizan por tener los anillos aromáticos A y B unidos por la cadena lineal de 3 carbonos sin ciclar, de modo que no poseen anillo heterocíclico C, en la que presentan un grupo cetona en posición 4. Las chalconas son pigmentos amarillos responsables de la coloración de algunas flores y frutas y son poco frecuentes en los vegetales de la dieta. Las podemos encontrar en las manzanas y en el lúpulo o la cerveza.

Los *flavonoles* presentan un grupo cetona en la posición 4, un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, y un grupo hidroxilo en posición 3. Son los flavonoides más extendidos en los alimentos y los principales representantes de este grupo son la quercetina y el kaempferol. Las principales fuentes alimentarias de flavonoles son la cebolla, la col, el puerro, el brócoli, la lechuga, el tomate, la manzana, las uvas y los arándanos. Además de en verduras y frutas, también encontramos estos compuestos en el té y el vino tinto. Los flavonoles suelen presentarse de forma glucosilada, generalmente con glucosa o rramnosa, aunque pueden estar implicados otros azúcares.

Las *flavonas* tienen un doble enlace entre las posiciones 2 y 3 y un grupo cetona en posición 4. Son poco comunes en frutas y verduras, siendo las principales fuentes alimentarias el perejil, el apio, el pimiento rojo, la camomila, la menta y algunos cereales como el mijo y el trigo. Las flavonas más comunes son la luteolina y la apigenina, que aparecen fundamentalmente como glucósidos.

Las *flavanonas* y los *flavanonoles* presentan un anillo C saturado con un grupo cetona en posición 4. Estos dos grupos se diferencian por la presencia de un grupo hidroxilo en posición 4 en los flavanonoles. Se encuentran en los tomates y algunas plantas

aromáticas como la menta, pero la principal fuente son los cítricos. Las flavanonas suelen presentarse en forma glucosilada con un disacárido generalmente en posición 7, aunque existen tres aglicones muy comunes que son naringenina (en la uva), hesperetina (en la naranja) y eriodictiol (en el limón). Uno de los flavanoles que se encuentran con mayor frecuencia es la taxifolina.

Las *isoflavonas* y los *neoflavonoides* se caracterizan por presentar el anillo aromático B en una posición diferente en comparación con la estructura básica de los flavonoides. Las isoflavonas poseen el anillo B en la posición 3, un doble enlace entre las posiciones 2 y 3, y el grupo cetona en el carbono 4. Los neoflavonoides presentan el anillo B en el carbono 4, un doble enlace entre las posiciones 3 y 4, y el grupo cetona en posición 2. Las isoflavonas poseen una estructura similar a los estrógenos presentando grupos hidroxilo en posición 7 y 4', como sucede con la estructura molecular del estradiol. Esta característica les confiere propiedades hormonales como la unión a los receptores de estrógeno, por lo que son clasificadas como fitoestrógenos. Las isoflavonas se encuentran casi exclusivamente en las leguminosas, siendo la soja y sus derivados la principal fuente de isoflavonas de la dieta. Las principales isoflavonas presentes en la soja son genisteína, daidzeína y gliciteína que aparecen como agliconas o conjugadas con glucosa. Los neoflavonoides son compuestos poco frecuentes que se encuentran principalmente en plantas medicinales, siendo la dalbergina el neoflavonoide más ampliamente distribuido.

Los *flavan-3-ol* se conocen también como catequinas y su estructura se caracteriza por tener un anillo C saturado (sin dobles enlaces), por no presentar grupos cetona y por poseer un grupo hidroxilo en posición 3 (en donde puede haber también un grupo galato). Los flavan-3-ol más representativos son la catequina y la epicatequina, isómeros *trans* y *cis* respectivamente, y se encuentran en muchas frutas como las uvas, las manzanas, los arándanos, los plátanos, los melocotones y las peras. Los derivados de la catequina y epicatequina (galocatequina, epigalocatequina y sus galatos) se encuentran mayoritariamente en el té y el cacao. Al contrario que las otras clases de flavonoides, las catequinas aparecen como agliconas en los alimentos.

Las *antocianidinas* presentan un catión pirulina como anillo C y poseen un grupo hidroxilo en la posición 3. Estos compuestos aparecen en los alimentos como

glucósidos asociados con una molécula de glucosa en la posición 3 del anillo C o en las posiciones 5 y 7 del anillo A, y reciben el nombre de *antocianinas*. Las principales antocianinas son la cianidina, delfidina, malvidina, pelargonidina y peonidina que se encuentran ampliamente distribuidas en la dieta. Encontramos estos compuestos en el vino tinto, algunas variedades de cereales, en raíces y vegetales pero aparecen principalmente en las frutas del bosque (arándanos, grosellas, uvas, frambuesas, fresas, moras...).

Los taninos se dividen en dos grupos en función de su estructura química: taninos condensados y taninos hidrolizados, y están presentes en hojas, frutos y cortezas. Los *taninos condensados* son oligómeros (*procianidinas*) o polímeros (*proantocianidinas*) de flavan-3-ols, siendo los dímeros y los trímeros las formas mayoritarias. Al estar constituidas por catequinas, en ocasiones se clasifican dentro de los compuestos flavonoides. Según la unión entre los monómeros, los taninos condensados pueden presentar una estructura tipo B, donde las uniones tienen lugar entre los carbonos 4 y 6 o los carbonos 4 y 8, o una estructura tipo A que presenta un enlace éter adicional entre la posición 2 y la 7. La configuración más común en los alimentos es la estructura tipo B. Los taninos condensados se encuentran en frutas como las uvas, los melocotones, las manzanas y las peras, en bebidas como el vino, la sidra, la cerveza o el té, y en el chocolate. Los *taninos hidrolizables* consisten en unidades de ácido gálico o ácido elágico esterificadas con residuos glucídicos, principalmente la glucosa. En función de los productos resultantes de su hidrólisis, se dividen en *galotaninos* (que originan el ácido gálico) o en *elagitaninos* (cuya hidrólisis da lugar al ácido elágico). Los taninos hidrolizables se encuentran en frutas como las fresas, las uvas, las frambuesas, el mango o las bayas, así como en legumbres y verduras de hoja verde.

Los estilbenos están formados por dos anillos aromáticos unidos por una cadena de carbonos que presenta un doble enlace. Estos compuestos se encuentran en dos formas isómeras, en forma *trans* y en forma *cis*, siendo esta última menos estable. Los estilbenos aparecen en bajas cantidades en la dieta y el mayor representante de este grupo es el resveratrol, que suele presentarse como glucósido. La piel de las uvas es rica en resveratrol, de ahí que fuentes importantes de este compuesto fenólico sean el vino tinto y el zumo de uva. Otras fuentes de resveratrol son el cacahuete, los pistachos, las bayas, la lombarda y las espinacas. Los estilbenos aparecen en forma de monómeros o

pueden sufrir reacciones de condensación dando lugar a oligómeros, y también pueden presentar diferentes sustituciones como azúcares.

Los lignanos son compuestos fenólicos dímeros de unidades de fenilpropanoide (C6-C3) y el mayor representante en la dieta es la semilla de lino. Se han encontrado lignanos en otras fuentes alimentarias como cereales, granos, frutas y hortalizas, pero en concentraciones muy inferiores en comparación con el lino. Los lignanos se encuentran principalmente en forma libre, siendo sus glucósidos compuestos minoritarios en los alimentos.

#### 2.5.2. Biodisponibilidad y metabolismo y de los compuestos fenólicos

La biodisponibilidad se define como la fracción de un nutriente o compuesto ingerido que alcanza el sistema circulatorio y/o los sitios específicos donde va a ejercer su función biológica. Existen diferentes factores que van a afectar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de la dieta, como son la matriz en la que se encuentran, si el alimento ha sufrido algún tipo de procesado que pueda afectar la absorción de los compuestos, los factores relacionados con el consumidor como los hábitos de consumo (en cuanta cantidad y frecuencia) y las características individuales de su organismo relacionadas con el metabolismo (antecedentes genéticos, caracterización de la microbiota intestinal...), y los factores relacionados con la estructura química de los compuestos fenólicos (solubilidad, polimerización, presencia de grupos funcionales...) (Gutiérrez-Grijalva, Ambriz-Pérez, Leyva-López, Castillo-López y Heredia, 2016).

La biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos han sido estudiados fundamentalmente en animales monogástricos, donde se ha observado que su ruta metabólica varía en función de la estructura química que presenten. Los compuestos fenólicos en su forma aglicona son mayoritariamente absorbidos directamente. Sin embargo, los compuestos fenólicos suelen presentarse en los alimentos formando glucósidos, ésteres con otros compuestos químicos (como los ácidos orgánicos) y/o estructuras más complejas en forma de polímeros, que no son absorbidos en su forma nativa. Estos compuestos más complejos tienen que ser hidrolizados para que las agliconas se liberen y puedan ser metabolizados (Manach et al, 2004; Scalbert y Williamson, 2000).

De una forma general, a nivel estomacal se absorben alguna proantocianidinas con bajo nivel de polimerización, como los dímeros. En el intestino delgado se absorben directamente las agliconas, y aquellos glucósidos formados por glucosa son hidrolizados y se absorbe su forma aglicona también a este nivel. Al intestino grueso llegan las formas más complejas, donde la microflora del colon hidrolizan los enlaces de los compuestos esterificados y glucosilados, liberando las agliconas para ser absorbidas. En el colon tiene lugar también la degradación de proantocianidinas de estructura mayor a dímeros, liberando sus constituyentes monoméricos (catequinas) para poder ser absorbidos (Manach et al, 2004; Scalbert y Williamson, 2000).

Una vez que las agliconas de los compuestos fenólicos son absorbidas, tienen lugar en el intestino delgado y, principalmente, en el hígado otras modificaciones estructurales que van a repercutir en las propiedades biológicas de los compuestos fenólicos y están encaminadas a facilitar su excreción. Estos compuestos modificados penetran en los tejidos del organismo, principalmente en aquellos tejidos donde se han metabolizado, como es el tejido estomacal, el intestinal, el hepático y el colónico.. Sin embargo, una alta proporción de los compuestos fenólicos ingeridos por los animales monogástricos son eliminados vía biliar o mediante la orina (Manach et al, 2004; Scalbert y Williamson, 2000).

En rumiantes, por el contrario, existen muy pocos estudios sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y los resultados difieren entre los trabajos realizados. Algunos autores indicaron que la falta de efecto de la incorporación de compuestos fenólicos en la dieta de rumiantes, se puede deber a que son excretados en la orina sin poder llegar a depositarse en los tejidos o a una transformación en el rumen que los convierte en formas no activas (O'Grady, Maher, Troy, Moloney y Kerry, 2006). Para dilucidar la posible biodisponibilidad de los compuestos fenólicos en los rumiantes, se ha estudiado la absorción de diferentes compuestos fenólicos procedentes del romero, la uva, las frutas cítricas y la caléndula en el plasma de los rumiantes (Gladine, Rock, Morand, Bauchart y Durand, 2007).

Así, en el caso del romero, no se observaron compuestos fenólicos presentes en el extracto (ácido carnósico) o sus metabolitos (ácido ferúlico, cafeico o cumárico), pero sí se detectaron otro tipo de compuestos fenólicos sugiriendo que los polifenoles del

romero fueron metabolizados en el rumen por la microflora, dando lugar a compuestos diferentes (Gladine et al., 2007). Sin embargo, otros estudios indicaron la transferencia de compuestos fenólicos presentes en el romero al músculo de los rumiantes, encontrándose ácido rosmarínico, carnosol y, mayoritariamente ácido carnósico en la carne de corderos (Moñino, Martínez, Sotomayor, Lafuente y Jordán, 2008).

En cambio, las proantocianidinas del extracto de uva que en monogástricos no son absorbidas si presentan estructura superior a dímeros, parecen ser hidrolizadas por los microorganismos en el rumen dando lugar a sus monómeros (catequina y epicatequina), que sí serían posteriormente absorbidos (Gladine et al., 2007). En este sentido, se ha observado un mayor contenido total en compuestos fenólicos (medido con el reactivo de Folin-Ciocalteu) en el músculo de rumiantes alimentados con una dieta suplementada con proantocianidinas (Luciano, Vasta, Monahan, López-Andrés, Biondi, Lanza y Priolo, 2011; Qwele, Hugo, Oyedemi, Moyo, Masika y Muchenje, 2013). No obstante, estos estudios no analizaron los compuestos fenólicos individualmente, por lo que un mayor valor en el contenido fenólico puede deberse a la reacción del reactivo Folin-Ciocalteu con otros antioxidantes presentes en el músculo. De hecho, otros autores no encontraron compuestos fenólicos en plasma o en hígado al incorporar proantocianidinas en su dieta, pero sí una mayor capacidad antioxidante en plasma, hígado y músculo (López-Andrés, Luciano, Vasta, Gibson, Biondi, Priolo y Mueller-Harvey, 2013).

Se ha observado también que compuesto fenólicos procedentes de las frutas cítricas como la naringina, se han incorporado también en el plasma de los rumiantes tras una hidrólisis, posiblemente en el rumen, de la fracción glucosídica de modo que son absorbidos en su forma aglicona (naringenina), como sucede en monogástricos (Gladine et al., 2007). La naringenina se detectó también en el hígado de los rumiantes cuando en la dieta se incorporó naringina, confirmando que se absorbe en su forma aglicona, aunque este compuestos fenólico no llegó a depositarse en músculo (Bodas, Prieto, Jordán, López-Campos, Giráldez, Morán y Andrés, 2012).

Otros ácidos fenólicos, como el ácidos vanílico, cafeico, clorogénico, *p*-cumárico y ferúlico suministrados a lo rumiantes en forma de extracto de la caléndula, no se encontraron en su forma nativa en el plasma de los animales, aunque se detectaron otros

compuestos fenólicos, por lo que al igual que se observó con el romero, estas moléculas fueron metabolizadas en el rumen y transformadas en compuestos diferentes (Gladine et al., 2007).

Por lo tanto, la posible disponibilidad de los compuestos fenólicos tras haber pasado el rumen, depende del tipo de estructura de estos compuestos y de la dosis suministrada a los animales, ya que en el trabajo de Gladine et al. (2007), esta dosis fue muy elevada (10% MS de la ingesta) e incorporada en una única dosis directamente en el rumen de los animales, con el objetivo de estudiar en concreto la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos. Estos compuestos pueden sufrir modificaciones por la microbiota del rumen originando nuevos compuestos que podrían conservar su capacidad antioxidante (Gladine et al., 2007).

### 2.5.3. Propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son multifuncionales y su actividad antioxidante la ejercen como agentes reductores, cediendo átomos de hidrógeno o electrones, captando moléculas de oxígeno singlete o quelando metales (Rice-Evans, Miller y Paganga, 1996; Shahidi y Naczk, 2004b). Además, los radicales intermediarios que se forman en su actividad como antioxidantes son relativamente estables gracias a la deslocalización de los electrones desapareados en el anillo aromático y a la falta de sitios útiles de unión a moléculas de oxígeno, lo que les convierte en unos antioxidantes muy efectivos (Shahidi y Naczk, 2004b).

La actividad antioxidante de los *ácidos fenólicos* y sus ésteres depende básicamente del número y de la posición de los grupos funcionales en su estructura. En este sentido, la capacidad antioxidante de los ácidos hidroxibenzoicos y de los ácidos hidroxicinámicos mejora a medida que aumenta el número de grupos hidroxilo (-OH) y de grupos metoxilo (-OCH<sub>3</sub>) en su estructura. Sin embargo, el grupo carboxilo (-COOH) de los ácidos hidroxibenzoicos tiene una alta capacidad de captar electrones, lo cual reduce el potencial antioxidante de los grupos funcionales (grupos hidroxilo y/o grupos metoxilo), de modo que aquellos situados en la posición *meta* (más alejada del grupo carboxilo) resultan más efectivos en comparación con los grupos situados en posición *orto* y *para* respecto al grupo funcional -COOH. Por el contrario, la presencia del grupo -CH=CH-COOH en los ácidos hidroxicinámicos facilita la cesión de átomos de

hidrógeno y la estabilización del subsecuente radical formado tras su oxidación. Por este motivo, a igual número y posición de los grupos funcionales hidroxilo y metoxilo en el anillo aromático, los ácidos hidroxibenzoicos resultan menos efectivos en los procesos antioxidantes que los ácidos hidroxicinámicos. La presencia de grupos esterificados en los ácidos fenólicos también reduce la efectividad de estos compuestos como agentes antioxidantes. (Rice-Evans et al., 1996).

La actividad antioxidante de los *alcoholes fenólicos* está determinada por su estructura, la cual influye de una forma muy similar a lo que ocurre en los ácidos fenólicos. La presencia de dos grupos hidroxilo consecutivos en el anillo aromático, dando lugar a un grupo catecol, es una característica crucial para la actividad antioxidante de los alcoholes fenólicos. También influye el número, a mayor número de grupos hidroxilo y de grupos metoxilo en el anillo aromático, mayor la actividad antioxidante del compuesto. Sin embargo, hay que tener en cuenta que si el grupo metoxilo sustituye a un grupo hidroxilo, la capacidad antioxidante disminuye en comparación con un compuesto que presente el mismo número de grupos funcionales pero siendo todos grupos hidroxilo. Los alcoholes fenólicos presentan diferentes longitudes en su cadena alquílica en función del compuesto, lo cual va a influir también en la actividad antioxidante. En general, una mayor longitud de la cadena alquílica mejora las propiedades antioxidantes de los compuestos ya que se aumenta la capacidad de donar electrones, por lo que el radical formado tras la actividad antioxidante presenta una mayor estabilidad (Morales y Lucas, 2010).

La funcionalidad de los compuestos *flavonoides* está igualmente relacionada con su estructura química y con la disposición de los grupos funcionales (Rice-Evans et al., 1997). De esta forma, para la capacidad neutralizadora de radicales libres, los grupos estructurales más destacados son: (1) grupos hidroxilo en la posición 3' y 4' del anillo C, esto es, la presencia de un grupo catecol, (2) grupos hidroxilo en la posición 5 y 7 en el anillo A y (3) doble enlace entre la posición 2 y la 3, presencia de un grupo cetona en posición 4 y de un grupo hidroxilo en posición 3, en el anillo C. Para la capacidad quelante de metales, la disposición más óptima de los grupos funcionales es: (1) grupo catecol en las posiciones 3' y 4' del anillo B y (2) grupo cetona en posición 4 junto con un hidroxilo en posición 3 o en posición 5 (Rice-Evans et al., 1997). El grupo funcional

más relevante para la actividad antioxidante de los flavonoides es la presencia del grupo catecol en el anillo B. En aquellos compuestos fenólicos en los que no esté presente este grupo, la estructura básica (enlace doble entre la posición 2 y 3, y/o grupo hidroxilo en posición 3 y/o grupo cetona en posición 4) pasa a tener gran relevancia y, entre aquellos compuestos que comparten una estructura común, el número de grupos hidroxilo pasa a ser determinante para una mayor actividad antioxidante (Silva, Santos, Carço, Rocha, Justino y Mira, 2002). El bajo potencial redox de los flavonoides les hace termodinámicamente capaces de reducir los radicales libres con alta capacidad oxidante como son el radical superóxido, peroxilo, alcoxilo e hidroxilo, a través de la cesión de un átomo de hidrógeno. Mediante la capacidad quelante de metales, los flavonoides también previenen la formación de radicales libres ya que estos metales se unen a sitios específicos de su estructura evitando su posible acción oxidante (Kumar y Pandey, 2013).

En el caso de los *taninos hidrolizables*, a mayor número de grupos hidroxilo mejor capacidad de captar radicales libres. El poder reductor de los radicales libres está influenciado por el número de grupos galato disponibles en la molécula. En el caso de los elagitaninos, la habilidad de quelar metales parece ser el modo de acción predominante, antes que la captación o neutralización de radicales libres, siendo compuestos con moderada actividad frente a radicales hidroxilo (HO•) (Moilanen, Karonen, Tähtinen, Jacquet, Quideau y Salminen, 2016).

Al igual que ocurre en el resto de familias fenólicas, las propiedades antioxidantes de los *estilbenos* están directamente relacionada con su estructura química, siendo el número y la posición de los grupos hidroxilo un factor estructural determinante, de modo que la presencia de grupos metilo en lugar de grupos hidroxilo reduce su potencial antioxidante. La presencia del doble enlace en la estructura básica de los estilbenos también es importante para su actividad antioxidante y el isómero *cis* resulta menos efectivo como antioxidante aunque presenta la misma capacidad de ceder átomos de hidrógeno. Se ha visto que la presencia de un grupo hidroxilo en posición 4' en la estructura del *trans-resveratrol* tiene gran importancia a la hora de ejercer su actividad antioxidante ya que la cesión del átomo de hidrógeno en esta posición da lugar a un radical fenoxilo más estable que si la abstracción del hidrógeno se realiza en otras posiciones (Stivala et al., 2001).

#### 2.5.4. Compuestos fenólicos de la uva: Caracterización

Los compuestos fenólicos son sintetizados en la vid durante el desarrollo normal de la planta como respuesta a condiciones de estrés y su contenido va a estar altamente influenciado por el tipo de cultivo (especie, origen genético y variedad), las prácticas agrícolas, la composición del suelo, el clima, la localización geográfica y la exposición a agentes estresantes como infecciones fúngicas (Koyama, Kamigakiuchi, Iwashita, Mochioka y Goto-Yamamoto, 2017; Rodrigo, Miranda y Vergara, 2011; Zhu, Zhang y Lu, 2012). La época de la cosecha va a ser también un momento fundamental que determinará el perfil de compuestos fenólicos en la uva según las prácticas que se lleven a cabo y la aplicación de tratamientos específicos (Giovinazzo y Grieco, 2015).

Los compuestos fenólicos presentes en las uvas pertenecen a los grupos fenólicos de los ácidos fenólicos, los estilbenos, los flavonoides y los taninos condensados. Estos compuestos fenólicos se distribuyen principalmente en la semilla y en la piel de las uvas y, en menor proporción, en la pulpa (Rodrigo et al., 2011). Los ácidos fenólicos se encuentran en la piel, la semilla y la pulpa de las uvas y se encuentran en el fruto generalmente esterificados. Los ácidos hidroxicinámicos, como los ésteres del ácido tartárico, son más frecuentes mientras que los ácidos hidroxibenzoicos (como el ácido clorogénico) son compuestos minoritarios. Dentro de los estilbenos, el compuesto mayoritario presente en las uvas es el *trans*-resveratrol. Este grupo se encuentra en baja proporción y generalmente en forma de glucósidos. Como compuestos flavonoides están los flavan-3-ol, los flavonoles y las antocianinas. Los principales flavan-3-ols son la catequina, la epicatequina, la galocatequina y la epicatequina, que se acumulan principalmente en la piel y las semillas, y son bastante abundantes en la variedad de uva blanca, a diferencia del resto de grupos. Los flavonoles se encuentran en la piel de las uvas como glucósidos de quercetina y miricetina, y su presencia depende del tipo de uva, así el kaempferol y la quercetina se hallan en las uvas tintas y blancas mientras que la miricetina solo está presente en las uvas tintas. Las antocianinas se encuentran sólo en las uvas tintas y se acumulan en la piel, siendo las responsables del color rojizo-violáceo de esta uva. Se encuentran como glucósidos y otros derivados de la delphinina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina y malvidina. Los taninos condensados o proantocianidinas se acumulan en la semilla y la piel de la uva y, junto con los flavan-3-

ols, representan un 13-30% del contenido fenólico total de las uvas tintas. El grado de polimerización de los taninos condensados de las uvas es de dímero, trímero o tetrámero (Giovinazzo y Grieco, 2015; Giovinazzo, Ingrosso, Paradiso, De Gara y Santino, 2012; Koyama et al., 2017; Rodrigo et al., 2011; Zhu et al., 2012).

Cuando las uvas están siendo procesadas para la elaboración del vino, la piel y las semillas entran en contacto con el caldo de fermentación donde sufren una extracción que provee al vino de un contenido variable de compuestos fenólicos. Del mismo modo, en los procesos de envejecimiento de los vinos tintos, el perfil fenólico se ve alterado ya que estos compuestos van a estar sujetos a procesos de oxidación, a reacciones de condensación y polimerización y a procesos de extracción de otros compuestos de la madera de la bodega al zumo (Giovinazzo y Grieco, 2015). Por lo tanto, la composición fenólica del vino no va a depender solo de la variedad de uva usada, sino que factores como las técnicas empleadas en su elaboración van a ser muy influyentes. Las antocianinas, los flavonoles y las proantocianidinas son compuestos importantes responsables de la calidad del vino tinto ya que, de ellos dependen las principales características de esta bebida, como es el color, la amargura, la astringencia y la estabilidad química frente a los procesos oxidativos (Koyama et al., 2017). En general, en el vino se encuentran los mismo compuestos fenólicos que aparecen en la uva, aunque en proporciones variables. La principal diferencia en los vinos la encontramos en los ácidos fenólicos que sufren hidrólisis de los enlaces ésteres, de modo que en el vino los encontramos en su forma simple, así aparecen como ácidos hidroxycinámicos el ácido cumárico, cafeico y ferúlico, y como ácidos benzoico principalmente el ácido gálico. Otra diferencia en el vino tinto es que aparecen taninos hidrolizables procedentes de la madera de las bodegas (Waterhouse, 2002).

Tras la elaboración del vino, los restos de semilla, piel y hollejos que quedan después de la fermentación (lo que se conoce como el orujo del vino), contiene aún un alto contenido en compuesto fenólicos, siendo los más abundantes las antocianinas, ácidos hidrogenbenzoicos e hidrocimáticos, flavan-3-ols, flavonoles y estilbenos. Por lo tanto, estos residuos de la industria vitivinícola tienen gran interés como fuente de compuestos bioactivos (Fontana, Antonioli y Bottini, 2013).

### 2.5.5. Compuestos fenólicos de la aceituna: Caracterización

Los compuestos fenólicos de la aceituna constituyen entre un 1-3% de la composición total. Desde un punto cualitativo y cuantitativo, el contenido en compuestos fenólicos de la aceituna va a depender de diferentes parámetros entre los que se incluye la variedad de la oliva, las prácticas agrícolas (sistema de riego y tecnología empleada), el origen geográfico, las condiciones climáticas y el grado de maduración (Ghanbari, Anwar, Alkharfy, Gilani y Saari, 2012).

En la aceituna se encuentran compuestos fenólicos lipofílicos, como los cresoles, y compuestos hidrofílicos, entre los que se incluyen los ácidos fenólicos, los alcoholes fenólicos, los flavonoides y los secoiridoides. Dentro de los ácidos fenólicos hidroxibenzoicos se encuentran el ácido vanílico, el ácido siríngico y el ácido gálico. Como ácidos hidroxicinámicos están presentes el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido sinápico. En las aceitunas se halla también el verbascósido que es un glucósido del ácido cafeico, por lo tanto un derivado hidroxicinámico. Los principales alcoholes fenólicos en la aceituna son el hidroxitirosol y el tirosol. Entre los flavonoides, la aceituna presenta glucósidos de las flavonas luteolina y apigenina, y glucósidos de la antocianina cianidina. La oleuropeina es el secoiridoide más abundante en la aceituna verde ya que es degradado en las aceitunas negras como consecuencia del proceso de maduración del fruto. La oleuropeina es el compuesto responsable del sabor amargo de las aceitunas verdes (Ghanbari et al., 2012).

El contenido de compuestos fenólicos en el aceite de oliva virgen va a depender de los mismos factores que influyen su contenido en la aceituna (factores ambientales, variedad de aceituna, técnicas agrícolas) a los que hay que sumarles la tecnología de extracción y el tipo de conservación. Básicamente, los compuestos fenólicos que componen el aceite de oliva virgen son los mismos que se encuentran en la aceituna. Los ácidos fenólicos son compuestos minoritarios en el aceite de oliva y los más comunes son el ácido quínico, el vanílico, el ferúlico y el cumárico. El hidroxitirosol y el tirosol son los principales alcoholes fenólicos en el aceite de oliva, y la oleuropeina en su forma aglicona el principal secoiridoide. Se encuentran también, aunque en baja concentración, las flavonas luteolina y apigenina. También están presentes lignanos, que son compuestos de las semillas que pasan al aceite de oliva al machacar las aceitunas.

Los secoiridoides y los lignanos son los compuestos fenólicos más abundantes en el aceite de oliva virgen, aunque hay que tener en cuenta que sólo un 2% de los compuestos fenólicos de las aceitunas son incorporados al aceite de oliva (Ouni, Taamalli, Gómez-Caravaca, Segura-Carretero, Fernández-Gutiérrez y Zarraouk, 2011).

Al igual que ocurre con la industria vitivinícola, la producción del aceite de oliva da lugar a grandes cantidades de residuos que son de gran interés porque conservan compuestos fenólicos que pueden ser extraídos. Durante la elaboración del aceite de oliva se generan dos fracciones de residuos, una fase sólida u orujo (compuesta por la piel, la pulpa y las semillas de la aceituna) y una fase acuosa o alpechín. Esta última es de gran importancia porque es donde permanece el 98% de los compuestos fenólicos de las aceitunas. Entre los compuestos que se encuentran en las dos fracciones residuales se hallan: el hidroxitirosol, el tirosol, la oleuropeina, el tirosol, el ácido cafeico, el ácido cumárico, el ácido vanílico, el verbascosido, el ácido elenólico, el catecol y la rutina (Nunes, Pimentel, Costa, Alves y Oliveira, 2016).

### 2.5.6. Aplicación de los compuestos fenólicos en carne y producto cárnico

El uso de compuestos fenólicos en la carne y producto cárnico tiene como objetivo, no solo mejorar la estabilidad oxidativa del producto, si no también la búsqueda de un posible efecto beneficioso en la salud tras su ingesta.

#### 2.5.6.1. Empleo de compuestos fenólicos en alimentación animal

Los compuestos fenólicos más estudiados para la incorporación en la dieta de rumiantes son los taninos condensados, ya que están presentes en una gran parte de las plantas, por lo que son un componente común en su alimentación. Estos compuestos se usan incorporando partes de la planta que los presentan o en subproductos de la industria alimentaria, como por ejemplo el orujo de la elaboración del vino o del aceite de oliva (Guerra-Rivas, Vieira, Rubio, Martínez, Gallardo, Mantecón, Lavín, Manso, 2016; Apeleo, 2016). Otros de los compuestos con gran auge en alimentación de rumiantes son los aceites esenciales (romero, tomillo y orégano) por su gran capacidad antioxidante y porque parecen incorporarse mejor a los tejidos (Moñino et al., 2008). Además, otros estudios se encaminan a valorar el efecto de extractos con una composición conocida de los compuestos fenólicos, como el extracto de semilla de uva,

o el efecto de compuestos individuales, como el ácido carnósico (presente en el romero) o la quercetina (presente en la uva) (Andrés, Tejido, Bodas, Morán, Prieto, Blanco y Giráldez, 2013).

La diversa bibliografía disponible aporta disparidad de resultados que van a estar relacionados con la estructura química de los compuestos empleados, la dosis y la forma (extracto o aceite) en la que estos compuestos son suplementados en la dieta, así como a diferencias en el metabolismo y/o absorción de los mismos. Igualmente, los compuestos polifenólicos incorporados en la dieta de los animales van a ejercer su potencial antioxidante en la carne en función del músculo y del tipo de envasado, los cuales influyen en la dirección e intensidad de los procesos oxidativos.

Así por ejemplo, la incorporación de orujo procedente de la elaboración del vino (50 g/kg pienso) o de extracto de semilla de uva (50 mg/kg pienso), ambos aditivos ricos en taninos condensados, en la dieta de corderos no resultó en una mejora de la estabilidad oxidativa de la carne (*m. longissimus dorsi*) durante su conservación (14 días) en HiOx-MAP (Guerra-Rivas, 2016). Los valores de TBARs y la decoloración aumentaron a lo largo del periodo de conservación, aunque la incorporación de orujo del vino y de extracto de semilla de uva tendió a presentar unos valores de TBARs más bajos que la carne control. La valoración sensorial por parte de un panel entrenado en cuanto a apariencia y olor, tampoco mejoró con respecto al control. En otro trabajo realizado con los mismos animales, estos autores estudiaron la composición de ácidos grasos de la carne y no observaron diferencias importantes en el perfil lipídico al incorporar los compuestos fenólicos en la dieta de los corderos (Guerra-Rivas, Lavín, Gallardo, Mantecón, Vieira y Manso, 2013).

Sin embargo, cuando los taninos condensados son incorporados en la dieta de los animales en mayor cantidad y/o cuando proceden de diferente origen vegetal, se ha observado un efecto en la estabilidad oxidativa de la carne y en la calidad organoléptica, aunque según el estudio este efecto varía. Así, la suplementación de un 2.5% de la materia seca de la dieta (MS) de corderos con extracto de semilla de uva o de un 25% MS con *Cistus ladanifer* L., mejoró la estabilidad oxidativa de la carne (Jerónimo, Alfaia, Alves, Dentinho, Prates, Vasta, Santos-Silva y Bessa, 2012). Los valores de oxidación lipídica (*m. longissimus dorsi*) durante 7 días en refrigeración se mantuvieron

inferiores en la carne de los corderos suplementados, y este efecto se mantuvo también en la carne de aquellos corderos con una dieta enriquecida en PUFA (6% MS de una mezcla de aceite de girasol y aceite de lino). Los parámetros de color no se vieron afectados por la inclusión de los compuestos fenólicos ni por la incorporación de PUFA en la dieta de los corderos y las propiedades sensoriales tampoco se vieron afectadas respecto al control, de forma que el panel sensorial no apreció diferencias entre las distintas carnes. Además, en otro estudio de estos autores se observó que la incorporación de *Cistus ladanifer* L. junto con una mezcla de aceite de girasol y de lino, incrementó la deposición de los ácidos grasos 18:1 trans-11 y 18:2 cis-9,trans-11 en la grasa intramuscular, mientras que la adición del extracto de semilla de uva no modificó el perfil lipídico respecto a emplear en el pienso sólo la mezcla de aceites (Jerónimo, Alves, Dentinho, Martins, Prates, Vasta, Santos-Silva y Bessa, 2010).

La suplementación en la dieta de corderos con 8,96% MS de extracto de quebracho (*Schinopsis lorentzii*) (rico en taninos condensados) estabilizó el color de la carne picada (m. *semimembranosus*) conservada durante 14 días en HiOx-MAP (Luciano, Monahan, Vasta, Biondi, Lanza y Priolo, 2009). El índice de luminosidad y el índice de amarillo fueron menores en la carne de los corderos suplementados y la tonalidad (hue angle) permaneció estable durante la conservación. Sin embargo, la inclusión de taninos del quebracho en la dieta no influyó en la oxidación lipídica, la cual aumentó a lo largo de la conservación. Al analizar el m. *longissimus dorsi* en los mismos animales empleados en el estudio anterior, también se observó el efecto protector frente a la decoloración de la carne durante 7 días de conservación en refrigeración sin MAP, lo cual supone unas condiciones menos propicias a la oxidación tanto por el envasado como por tratarse de un músculo más estable respecto al color (Luciano, Vasta, Monahan, López-Andrés, Biondi, Lanza y Priolo, 2011). Estos autores analizaron el estatus antioxidante de la carne y encontraron que presentaba una mayor capacidad reductora y neutralizadora de radicales libres, además de un mayor contenido en polifenoles totales, en comparación con la carne de los corderos alimentados sin el extracto de quebracho.

La suplementación con el flavonol quercetina, como extracto de *Saphora japónica* L. (99% de pureza), en la cantidad de 2000 mg/kg y con semilla de lino al nivel de 85 g/kg en la dieta de corderos, también previno la decoloración de la carne (Andrés et al.,

2013). Se observó un menor índice de amarillo y una mayor estabilidad del tono (hue angle) en el m. *longissimus lumborum* conservado durante 7 días en refrigeración.

Moñino et al. (2008), incorporaron un 10% o un 20% del subproducto del destilado de hojas de romero en la dieta basal de ovejas gestantes para estudiar la posible transferencia de compuestos antioxidantes a la carne de cordero y su efecto en ella. Estos autores confirmaron la transferencia de compuestos presentes en las hojas del romero a la carne del cordero, como fueron el ácido romarínico, el carnosol y el ácido carnósico (siendo este último el encontrado en mayor concentración). La presencia de estos compuestos mejoró el estatus antioxidante de la carne (m. *longissimus dorsi*) al presentar un mayor potencial reductor y una mayor capacidad de neutralizar radicales libres en comparación con la carne control. Empleando el mismo tipo de animal y las mismas dosis de destilado de hojas de romero, se observó una mayor estabilidad durante la conservación (21 días en HiOx-MAP) del color (en términos de luminosidad e índice de rojo) y a una menor oxidación lipídica (medida en TBARs) en la carne de los corderos alimentados con la dieta suplementada, la cual obtuvo mayores puntuaciones para el color y el olor a cordero y menores para el olor a rancio, cuando fue evaluada por un panel sensorial entrenado (Nieto, Díaz, Bañón y Garrido, 2010).

El empleo de ácido cárnosico como suplemento en la dieta de corderos al nivel de 1,2 g/kg pienso aumentó la estabilidad del color en el músculo *gluteus medius* durante su conservación (MAP: 35% CO<sub>2</sub>/35% O<sub>2</sub>/30% N<sub>2</sub>) en refrigeración durante 14 días y no fue distinguido ni preferido por un panel de consumidores respecto del control, por lo que el ácido carnósico no aportó ningún sabor diferente a la carne (Morán, Rodríguez-Calleja, Bodas, Prieto, Giráldez y Andrés, 2012). Sin embargo, estos autores no observaron diferencias respecto al color en el músculo *longissimus lumborum*, posiblemente al tratarse de un músculo con mayor estabilidad del color. Cuando estos autores emplearon la carne de los mismos animales para estudiar la estabilidad oxidativa (Morán, Andrés, Bodas, Prieto y Giráldez, 2012), observaron que en ambos músculos (*gluteus medius* y *longissimus lumborum*) la intensidad de la oxidación lipídica se redujo cuando los animales fueron alimentados con el ácido carnósico y este efecto fue, similar que para el color, más patente en el m. *gluteus medius*. Empleando los mismos animales, se analizó también la oxidación de las proteínas (grupos

carbonilos) en el músculo *longissimus lumborum*, sin observarse ningún efecto de la dieta. Sin embargo, la fuerza de corte fue menor en este músculo comparado con el control, con lo que parece que la suplementación con ácido carnósico afectó de alguna manera a las proteínas aunque no previno la formación de grupos carbonilo. En otro estudio realizado por los mismos autores, se observó que la suplementación de la dieta de los cordero con 0,12% de ácido carnósico no tuvo efecto en la proporción de ácidos grasos de la carne (Morán, Giráldez, Panseri, Aldai, Jordán, Chiesa y Andrés, 2013).

En un estudio parecido, pero usando un extracto de romero rico en ácido carnósico y en carnosol, se observó un efecto más marcado que usando sólo el ácido carnósico como suplemento en la dieta (Ortuño, Serrano, Jordán y Bañón, 2014). Estos autores estudiaron la incorporación de 200 o 400 mg extracto de romero/kg pienso en la vida útil de la carne (músculo *longissimus dorsi*) de cordero durante 14 días en HiOx-MAP y observaron que ambas dosis fueron suficientes para prevenir la oxidación lipídica (TBARs) y proteica (grupos carbonilo) durante su conservación en HiOx-MAP. Del mismo modo se mejoró la estabilidad del color, tanto para los parámetros instrumentales (índice de rojo y tonalidad) como para el análisis sensorial por un panel de expertos, lo cuales detectaron también mayor olor a carne de cordero y menor a rancio, valorando la carne de cordero como fresca (en función de la apariencia y el olor) durante más días en comparación con el control.

Vasta, Aouadi, Brogna, Scerra, Luciano, Priolo y Salem (2013) y Aouadi, Luciano, Vasta, Nasri, Brogna, Abidi, Priolo y Salem (2014) estudiaron también la incorporación de romero en la dieta de corderos, pero en este caso en forma de aceite esencial. Estos autores incorporaron en la dieta de los corderos 400 ppm de aceite esencial de romero o 400 ppm de aceite esencial de *Artemisa herba alba* (L.) y analizaron el perfil de ácidos grasos de la carne (músculo *longissimus dorsi*). La carne de los corderos alimentados con *Artemisa herba alba* presentaron una mayor proporción de ALA, lo que dio lugar a una proporción total de PUFA n-3 más elevada, reduciéndose la relación n-6/n-3. Por el contrario, el aceite esencial de romero no tuvo efecto y los autores indican que las diferencias podrían ser debidas a la diferente composición química de cada aceite de forma que, los terpenos presentes en el romero pudieron no interferir en la biohidrogenación ruminal o haber sido degradados por la microflora del rumen (Vasta et al., 2013). Al analizar la carne conservada durante 7 días en refrigeración, se observó

que presentaba una mayor capacidad reductora y una mayor habilidad para neutralizar radicales libres que el control (Aouadi et al., 2014). Sin embargo, este mayor estatus antioxidante de la carne no fue suficiente para prevenir los procesos oxidativos, de modo que tanto la oxidación lipídica como la decoloración aumentaron durante toda la conservación en la carne de los corderos alimentados con ambos aceites esenciales (Aouadi et al., 2014).

Se ha valorado también el efecto de la incorporación de pulpa de cítricos seca (rica en flavonoides) a dos niveles, 24% y 35% MS en la dieta de corderos sobre la estabilidad oxidativa de la carne (Gravador, Jongberg, Andersen, Lusiano, Priolo y Lund, 2014; Inserra, Priolo, Biondi, Lanza, Bognanno, Gravador y Luciano, 2014). Ambas dosis de pulpa de cítricos claramente redujeron la oxidación lipídica (TBARs) (Inserra et al., 2014) y proteica (grupos carbonilo y tiol) (Gravador et al., 2014) en la carne de cordero (*m. longissimus thoracis et lumborum*) conservada durante 6 días en refrigeración, sin embargo no tuvieron efecto sobre el color, el cual se deterioró a lo largo de la conservación (Inserra et al., 2014).

De manera similar, la incorporación de hesperidina de la pulpa de los cítricos a dos niveles, 1,5 y 3,0 g/kg en el pienso de corderos previno la oxidación lipídica en la carne (*m. longissimus*) conservada en refrigeración durante 9 días (Bodas, Prieto, Jordán, López-Campos, Giráldez, Morán y Andrés, 2012). Por el contrario, la inclusión de 1,5 g/kg de naringina (también presente en algunos cítricos) en la dieta de corderos no tuvo efecto sobre la oxidación lipídica ni la decoloración de la carne (*m. longissimus thoracis et lumborum*) conservada durante 9 días en refrigeración (Bodas et al. 2012). De la misma manera, no se encontró la forma aglicona de la naringina en el músculo, aunque sí se pudo detectar en el hígado (Bodas et al. 2012).

Apeleo (2016) evaluó la suplementación en la dieta de corderos con un extracto de aceituna (rico en hidroxitirosol) procedente del alpechín de la elaboración del aceite de oliva a dos niveles, 1,5 g/kg y 3,0 g/kg junto con la incorporación de 6% de lino extrusado y 1% de aceite de pescado, en la calidad de la carne. La suplementación con la dosis más alta presentó un porcentaje de MetMb menor en la carne de cordero (*m. longissimus dorsi*) conservada en HiOx-MAP durante 12 días. La oxidación lipídica y la oxidación proteica no se vieron afectadas por la adición del extracto, aumentando

durante todo el periodo de conservación. Igualmente, el contenido en ácidos grasos no se vio afectado por la dieta y los PUFA n-3 disminuyeron con la conservación debido a los procesos oxidativos, lo que provocó que disminuyera el olor y sabor a cordero y aumentara el sabor a rancio, según un panel sensorial entrenado.

### 2.5.6.2. Empleo de compuestos fenólicos en producto cárnico

Los compuestos fenólicos se han estudiado extensamente como antioxidantes naturales en la carne y productos cárnico, dando lugar a resultados muy favorables. Prueba de ello son las múltiples revisiones realizadas en los últimos años recogiendo los efectos de frutas y extractos de plantas en la estabilidad oxidativa de la carne roja y de ave (Karre, Lopez y Getty, 2013), o revisiones sobre diferentes extractos, incluyendo extractos comerciales, en carne roja (Shah, Bosco y Mir, 2014) y actualizaciones abarcando los posibles mecanismos de acción de los compuestos fenólicos (Kumar, Yadav, Ahmad y Narsaiah, 2015), así como su función como compuestos nutritivos (Jiang y Xiong, 2016) y no sólo como antioxidantes. En este apartado, por lo tanto, se incluyen las referencias más actuales y aquellas que estén relacionadas con los extractos empleados en esta tesis, i.e. subproductos, extractos o compuestos fenólicos de la uva y de la aceituna.

En relación a compuestos presentes en la uva, Gómez, Beriain, Mendizabal, Realini y Purroy (2016) valoraron el efecto de la incorporación de un extracto de semilla de uva (250 mg/kg carne) rico en compuestos fenólicos (con un contenido del 95%) en la estabilidad oxidativa de hamburguesas de vacuno enriquecidas en PUFA n-3 a través de estrategias alimentarias (inclusión del 10% de semilla de lino en la dieta de los animales) durante 6 días de conservación en refrigeración. La oxidación lipídica (medida en TBARs) se redujo durante el periodo de conservación en las hamburguesas con el extracto, sin embargo el color no estuvo afectado (en términos de L\*, a\*, C\* y H\*) por la adición del extracto de modo que la decoloración tuvo lugar en la misma intensidad que en las hamburguesas control. El extracto de semilla de uva no consiguió tampoco reducir la formación de MetMb en las hamburguesas enriquecidas con PUFA n-3, pero sí lo redujo, en comparación con hamburguesas sin el extracto y sin la incorporación de PUFA. Respecto a la valoración del color y del olor por un panel entrenado, las hamburguesas con el extracto fueron valoradas igual que el control para

el color de la carne cruda como para el de la carne cocinada, pero el olor de la carne con extracto, tanto en crudo como tras el cocinado, estuvo mejor valorado por el panel sensorial.

Varios extractos de subproductos de las actividades agroalimentarias se emplearon en la elaboración de salchichón fortificado con PUFA LCh a través de la inclusión de aceite de pescado microencapsulado (100 g/kg) (Munekata, Domínguez, Franco, Bermúdez, Trindade y Lorenzo, 2017). Los productos empleados fueron el extracto de residuos de la cerveza (rico en catequina, epicatequina y ácido benzoico), el extracto de hojas del castaño (rico en ácido gálico, catequinas y ácido protocatéutico) y el extracto de la piel del cacahuete (rico en catequina y ácidos protocatéuticos), que se añadieron en una dosis de 2000 mg/kg producto. La adición de los extractos no tuvo efecto en el color del salchichón, en cuanto a los parámetros del índice de amarillo ( $b^*$ ) y del índice de rojo ( $a^*$ ), aunque el extracto de hojas del castaño dio lugar a un salchichón con menor luminosidad ( $L^*$ ). La oxidación lipídica, medida por TBARs, no se vio afectada por la incorporación de los extractos pero la oxidación proteica se redujo al añadir el extracto de cerveza y, en menor grado, al añadir el extracto de hojas de castaño y de piel de cacahuete.

García-Lomillo, Gonzalez-SanJose, Pino-García, Ortega-Heras y Muñiz-Rodríguez (2017) utilizaron orujo del vino deshidratado como aditivo en hamburguesas de ternera. El orujo se empleó de tres formas, utilizando el orujo completo, utilizando sólo las semillas del orujo o utilizando sólo las pieles del orujo, y se añadió a las hamburguesas en una cantidad de 2 g/100 g carne. Los tres subproductos redujeron la oxidación lipídica, medida por la formación de TBARs, en las hamburguesas durante 15 días conservadas en HiOx-MAP, pero el subproducto formado solo por las pieles resultó claramente más efectivo. Del mismo modo, las pieles del orujo de uva redujeron la oxidación lipídica en las hamburguesas de vacuno, tanto crudas como cocinadas, durante 6 meses conservadas en congelación al vacío.

Otros residuos de las actividades agroalimentarias han sido también estudiados por Andrés, Petró, Adámez, López y Timón (2017) para valorar su influencia en la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cordero conservadas durante 7 días en refrigeración. Los extractos usados procedían de subproductos de la granada (con un

contenido total de compuestos fenólicos – CTF – de 134,79 mg GAE/g), del tomate (con un TPF de 13,78 mg GAE/g), de la uva (con un TPF de 32,16 mg GAE/g) y de la aceituna (con un TPF de 85,41 mg GAE/g). Estos extractos se añadieron en una cantidad de 1000 mg extracto/carne. La luminosidad no estuvo afectada por la adición de los extractos a excepción de las hamburguesas con extracto de aceituna que presentaron un valor de  $L^*$  más bajo al final de la conservación. Sin embargo, en cuanto al índice de rojo ( $a^*$ ), los extractos de uva y aceituna mantuvieron este parámetro en valores mayores en comparación con los otros extractos, e igualmente mantuvieron unos valores de oxidación lipídica (medida por TBARs) y oxidación proteica (medida por grupos tiol) menores que los otros dos extractos. Por el contrario, la textura se vio afectada tanto por el extracto de uva como por el de oliva, en cuanto a la dureza, la masticabilidad y la cohesión.

Cofrades, Salcedo, Delgado-Pando, López-López, Ruiz-Capillas y Jiménez-Colmenero (2011) evaluaron el efecto de la incorporación de un extracto de aceituna rico en hidroxitirosol (HXT) (40% MS), en salchichas de cerdo cocidas tipo frankfurt formuladas con una combinación de aceite de oliva, de semilla de lino y de pescado. Los aceites se incorporaron como una emulsión en agua (100 mg/kg) en una cantidad del 15.1% en las hamburguesas, y el extracto de aceituna se añadió en una concentración de 100 mg/kg carne. Las salchichas se conservaron en refrigeración durante 56 días. Las salchichas formuladas con el HXT presentaron mayor capacidad de neutralizar los radicales superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) pero no se observaron diferencias en la capacidad reductora respecto a las salchichas control. La oxidación lipídica, medida en TBARs, se redujo durante todo el periodo de conservación al incorporar el HXT en las salchichas.

Nieto et al. (2017) estudiaron el efecto de tres extractos de la oliva con diferente origen y extraídos mediante diferentes procesos. Así, emplearon un extracto procedente del alpechín con un contenido del 23% de hidroxitirosol (HXT1), otro procedente de las hojas del olivo con una proporción del 7% de HXT (HXT2), y el último procedía también del alpechín pero con un contenido en HXT del 7%. Los extractos se añadieron en una proporción de 50 ppm a salchichas de pollo y se evaluó su efecto en las salchichas conservadas en MAP (70%  $O_2$ /20%  $CO_2$ / 10%  $N_2$ ) durante 21 días en refrigeración. Los tres extractos afectaron por igual al color de las salchichas tras su

elaboración (día 0; no se estudió la evolución de color durante la conservación), presentando un valor de  $b^*$  menor y un valor de  $a^*$  mayor. La oxidación lipídica fue menor en las salchichas con HXT durante toda la conservación en comparación con el control al igual que la oxidación proteica evaluada por la pérdida de grupos tiol (los cuales se mantuvieron estables durante la conservación en las salchichas con HXT). Sin embargo, las hamburguesas formuladas con HXT2 y HXT3 presentaron una menor aceptabilidad por parte de un panel entrenado debido a que los panelistas pudieron detectar el sabor del HTX. Por este motivo, los autores escogieron el extracto HXT1 para evaluar su efecto como antioxidante en salchichas de pollo enriquecidas en ácidos grasos insaturados (UFA) mediante la incorporación de 20 g/100 g de aceite de oliva (fuente de MUFAs) y 2,5% de nueces (fuente de PUFA n-3) y conservadas en MAP (70% O<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub>/ 10% N<sub>2</sub>) durante 21 días en refrigeración comparado con un control con las fuentes de UFA sin extracto. La adición de HXT1 resultó en salchichas con un menor valor de  $L^*$ , sin afectar al índice de rojo ni de amarillo. La oxidación lipídica fue menor en las salchichas con HTX1 durante 14 días, sin embargo a día 21 de conservación no hubo diferencias con respecto al control. Los grupos tiol no estuvieron afectados por el periodo de conservación en ningún tipo de salchichas, pero aquellas formuladas con HTX1 presentaron valores más bajos que el control. No hubo diferencias entre las salchichas en cuanto a la aceptabilidad por el panel entrenado durante 14 días, sin embargo, a día 21 las salchichas sin el HTX1 recibieron mayor puntuación.

Botsoglou, Govaris, Ambrosiadis, Fletouris y Papageorgiou (2014) valoraron la incorporación de un extracto de hojas de oliva en la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cerdo enriquecidas en PUFA n-3 a través de la dieta (30 g aceite de semilla de lino/kg pienso) tras el cocinado y su conservación durante 9 días en refrigeración. El extracto de hojas de olivo empleado presentaba un CTF de 45.2 g GAE/kg siendo el compuesto mayoritario la oleuropeína y se incorporó en las hamburguesas de cerdo a tres niveles: 100 (TP100), 200 (TP200) y 300 (TP300) mg GAE/kg carne. Las tres dosis previnieron la oxidación de los lípidos (cuantificada por el contenido en MDA) y de las proteínas (medida por el contenido en grupos carbonilo) durante el cocinado, ya que los valores fueron inferiores a día 0 con respecto al control, y durante la conservación observándose una relación dosis-efecto. La oxidación proteica

medida por la pérdida de grupos tiol también estuvo afectada por la incorporación del extracto, pero en este caso la dosis menor (TP100) no resultó diferente del control y la relación dosis-efecto sólo se apreció en los grupos TP200 y TP300. La percepción sensorial de la hamburguesas evaluada por un panel entrenado, resultó acorde con los resultados sobre la estabilidad oxidativa, siendo las mejores valoradas respecto al olor y al sabor las hamburguesas con la mayor dosis de extracto (TP300) mientras que las hamburguesas TP100 fueron rechazadas en relación al sabor.

Siguiendo el mismo diseño experimental y utilizando el mismo extracto y en las mismas dosis (TP100, TP200 y TP300), Botsoglou, Govaris, Ambrosiadis, Fletouris y Botsoglou (2014) estudiaron el efecto de añadir el extracto de hojas de olivo en hamburguesas de cerdo enriquecidas en PUFA n-3 a través de la alimentación (30 g aceite de semilla de lino/kg pienso), pero en este estudio conservadas sin cocinar y en congelación durante 180 días. El resultado obtenido fue parecido al obtenido en hamburguesas conservadas en refrigeración. La oxidación lipídica se redujo durante toda la conservación en las hamburguesas con las tres dosis de extracto respecto al control, pero en diferente grado, de modo que se observó una relación dosis-efecto. La oxidación proteica, medida en grupos carbonilo y tiol se redujo con las dosis TP200 y TP300, siendo este efecto más patente con la dosis mayor. En relación a la calidad organoléptica, las hamburguesas TP100 fueron aceptables en cuanto al olor pero inaceptables para el sabor, mientras que las hamburguesas TP200 y TP300 fueron valoradas por el panel entrenado como aceptables tanto para el olor como para el sabor.

## 2.6. Vitamina E

### 2.6.1. Origen y estructura de la vitamina E

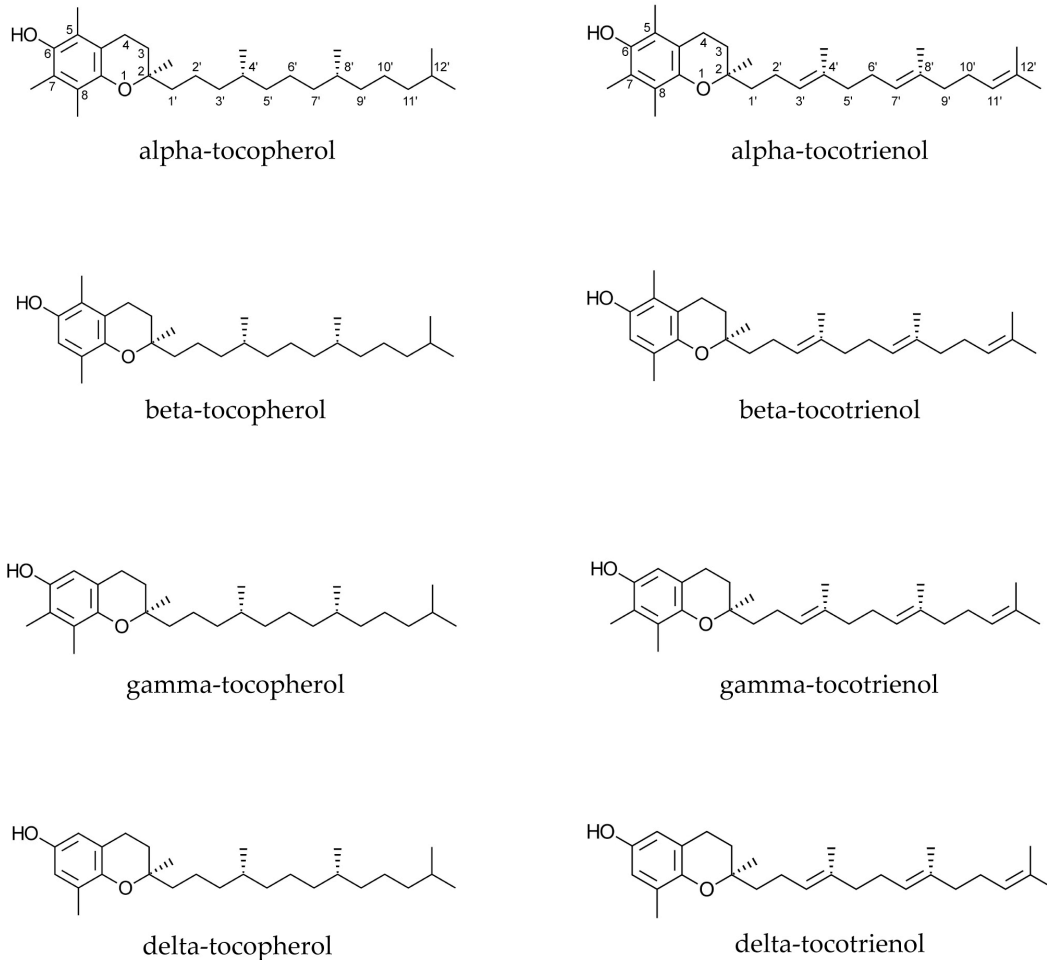
Vitamina E es el nombre genérico que agrupa a un conjunto de derivados tocoles sintetizados por las plantas y con actividad vitamínica. Los tocoles presentan una estructura común formada por un anillo cromano con un grupo hidroxilo (-OH) en posición 6 y una cadena lateral en la posición 2. Incluyen ocho compuestos diferentes que pertenecen a dos familias, los tocoferoles y los tocotrienoles. Los tocoferoles presentan una cadena lateral saturada, mientras que en los tocotrienoles esta cadena es insaturada con tres dobles enlaces en las posiciones 3', 7' y 11'. Dentro de cada familia se distinguen 4 vitámeros diferentes en función del número y posición de los grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) en el anillo cromano, designándose como alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) y delta ( $\delta$ ). Las formas  $\alpha$  tienen 3 grupos metilo en las posiciones 5, 7 y 8. Las formas  $\beta$  presentan dos grupos metilo en posición 5 y 8, y las formas  $\gamma$  tienen estos dos grupos metilo en posición 7 y 8. Por último, las formas  $\delta$  presentan sólo un grupo metilo en posición 8 (Figura 4) (Mustacich, Bruno y Traber, 2007; Shahidi y de Camargo, 2016).

Los tocoles son los antioxidantes liposoluble más importantes en los alimentos. La fracción lipídica de las semillas oleaginosas y de los frutos secos es la mayor fuente de tocoles, siendo su presencia generalmente escasa en la fruta debido a su bajo contenido lipídico. El  $\alpha$ -tocoferol se encuentra principalmente en los cacahuetes, las almendras y las semillas de girasol, mientras que el  $\gamma$ -tocoferol predomina en las nueces, los pistachos y las semillas de soja. De este modo, el  $\alpha$ -tocoferol y el  $\gamma$ -tocoferol se encuentran en muchos de los aceites alimentarios, como es el aceite de almendra, el de oliva, el de soja o el de maíz. El  $\delta$ -tocoferol se encuentra en las semillas de tomate, el germen del arroz y el aceite de soja. Los tocotrienoles son menos abundantes que los tocoferoles en los frutos secos, y aparecen principalmente en el aceite de palma, y en algunos cereales como la cebada (Jiang, 2014; Shahidi y de Camargo, 2016).

### 2.6.2. Biodisponibilidad y metabolismo de la vitamina E

La vitamina E es un compuesto liposoluble, por lo que su absorción está ligada a la digestión y absorción de la grasa alimentaria. De hecho, la absorción de la vitamina E se

reduce cuando es ingerida como suplemento en ausencia de grasa alimentaria.



**Figura 4.** Estructura química de los tocofenoles y los tocotrienoles (Shahidi y de Camargo, 2016).

A nivel intestinal, la secreción de esterasas pancreáticas y ácidos biliares hace que la vitamina E se integre en micelas que pueden atravesar la membrana de los enterocitos por difusión pasiva. La absorción a nivel intestinal presenta la misma eficiencia tanto para los tocoferoles como para los tocotrienoles que son incluidos en los quilomicrones junto con los triglicéridos, los fosfolípidos y el colesterol. Los complejos quilomición-vitamina E son secretados al sistema linfático y, parte de ellos, son transportados a los tejidos, incluyendo el músculo, la médula ósea, el tejido adiposo y la piel. Una vez en los tejidos, la vitamina E (fundamentalmente  $\alpha$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol) es incorporada por lipoproteínas que actúan como receptores de membrana. El resto de vitamina E

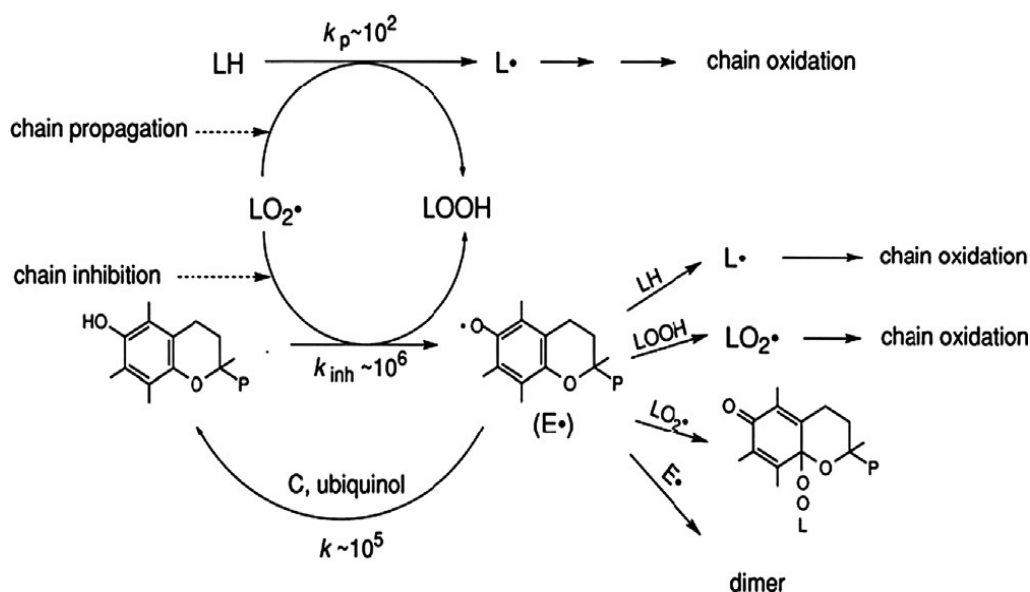
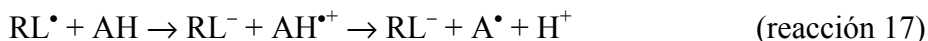
unida a los quilomicrones es transportada al hígado donde se incorpora a lipoproteínas que transportan la vitamina E a otros tejidos a través del torrente sanguíneo. A este nivel existe una preferencia por el isómero  $\alpha$ -tocoferol, en comparación con las otras formas de vitamina E, que facilita su secreción desde el hígado a la circulación, mientras que el resto de formas de vitamina E son catabolizadas en el hígado. Sin embargo, a pesar de esta selectividad por el  $\alpha$ -tocoferol, su acumulación en el plasma y tejidos no alcanza niveles tóxicos, ya que existe una regulación entre la absorción y la excreción del  $\alpha$ -tocoferol que controla su biodisponibilidad y evita un exceso de acumulación. Por lo tanto, el  $\alpha$ -tocoferol y sus metabolitos que excedan las necesidades nutricionales van a ser excretados a través de la bilis, la orina o las heces junto con el resto de formas de vitamina E y sus metabolitos (Jiang, 2014; Mustacich et al, 2007).

### 2.6.3. Propiedades antioxidantes de la vitamina E

La vitamina E se caracteriza por ser un antioxidante liposoluble que ejerce su actividad como captador de radicales libres ( $RL^{\bullet}$ ) al tener la capacidad de ceder átomos de hidrógeno, siendo el grupo hidroxilo en la posición 6 el sitio activo para desarrollar su actividad. De esta manera, la vitamina E frena o retrasa la fase de propagación de los procesos oxidativos. Las diferentes formas de tocoferoles y tocotrienoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) presentan una capacidad de captar radicales libres muy similar en sistemas *in vitro*, ya que presentan una habilidad para donar átomos de hidrógeno muy similar. No obstante, su reactividad relativa frente a los radicales libres decrece en el siguiente orden  $\alpha > \beta = \gamma > \delta$  al disminuir el número de grupos metilo presentes en el anillo cromano (Figura 4) (Niki, 2014; Traber y Atkinson, 2007).

La vitamina E (AH) capta radicales libres principalmente cediendo un átomo de hidrógeno (H) dando lugar a un producto no radical (RLH) y a un radical tocoferilo ( $A^{\bullet}$ ) (reacción 16). Bajo determinadas condiciones, la vitamina E puede ejercer su actividad transfiriendo un electrón, dando lugar a un radical catión de la vitamina E que rápidamente sufre desprotonación dando lugar al radical tocoferilo (reacción 17) (Niki, 2014). Estos radicales tocoferilo generados tras la neutralización de radicales libres, pueden seguir 4 caminos (Figura 5): reaccionar con un agente reductor dando lugar a una nueva molécula de vitamina E intacta; atacar otras moléculas biológicas originando

nuevos radicales que continúan el proceso oxidativo; reaccionar con otros radicales moleculares dando lugar a un aducto; o reaccionar con otro radical tocoferilo generando un dímero estable no radical (Niki y Traber, 2012).



**Figura 5.** Actividad antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol como captador de radicales en el proceso de la oxidación lipídica (Niki, 2012). LH: molécula lipídica; LOOH: hidropéroxido lipídico; LOO•: radical peroxilo lipídico; E•: radical tocoferilo; L•: radical lipídico; C: ácido ascórbico (vitamina C).

El efecto antioxidante de la vitamina E, en concreto del isómero  $\alpha$ -tocoferol, en los tejidos se debe, además de a su habilidad de donar átomos de hidrógeno, a su localización y movilidad en las membranas celulares y a la regeneración del radical fenoxilo de nuevo en  $\alpha$ -tocoferol por otros agentes reductores. La localización del  $\alpha$ -tocoferol es embebido en las membranas celulares, específicamente en aquellos dominios donde se acumulan los PUFA (Atkinson, Harroun, Wassall, Stillwell y Katsaras, 2010). Por lo tanto, esta posición fisiológica le permite actuar eficientemente contra la propagación de la autooxidación neutralizando los radicales peroxilo en el punto de origen e interviniendo en la fase de propagación. De hecho, el  $\alpha$ -tocoferol

reacciona mucho más rápido que los lípidos con los radicales peroxilo (aumentando así su efectividad) (Niki y Noguchi, 2004). Por último, como perfeccionamiento de su actividad biológica, el radical fenoxilo generado tras la cesión de un átomo de hidrógeno es muy poco reactivo y se regenera, como se ha indicado, de nuevo en  $\alpha$ -tocoferol por la acción de compuestos reductores, principalmente por el ácido ascórbico (vitamina C) (Niki, 2014; Niki y Noguchi, 2004).

#### 2.6.4. Aplicación de la vitamina E en carne y producto cárnico

##### 2.6.4.1. Empleo de la vitamina E en alimentación animal

Los estudios seleccionados en este apartado se realizaron en corderos de razas españolas, ya que la variación entre países en cuanto al periodo de engorde, edad y peso de sacrificio (Díaz et al., 2005) y en cuanto a las preferencias de los consumidores en lo relativo al sabor de la carne (por ejemplo, más o menos intensidad a sabor a cordero) (Font i Furnols et al., 2009) varían entre países, por lo que las diferencias encontradas podrían deberse a más factores que sólo la cantidad y la duración de la suplementación en la dieta con vitamina E.

El aumento de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en carne se consigue suplementando la dieta de los animales con dosis de acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo (vitamina E) superiores a las recomendables para cubrir los requerimientos nutricionales en alimentación de los rumiantes. Este aumento de vitamina E en músculo va a dar lugar a carnes más estables durante la conservación en relación a los procesos oxidativos y la decoloración (Liu, Lanari y Schaefer, 1995). Sin embargo, un aumento de las cantidades de vitamina E usadas va a suponer también un incremento en los costes de producción agrícola, por lo que es necesario que las dosis administradas sean las mínimas necesarias para mejorar la calidad de la carne durante el periodo de conservación.

Por este motivo, Álvarez, De la Fuente, Díaz, Lauzurica, Pérez y Cañeque (2008) estudiaron la suplementación en la dieta con diferentes dosis de acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo para establecer la dosis mínima necesaria que eficientemente reduzca los procesos oxidativos en la carne. Se evaluaron 3 dosis: 250, 500 y 1000 mg acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo/kg pienso durante un periodo medio de engorde de 37 días, con un peso inicial de los animales de 13 kg y un peso de sacrificio de 26 kg. El m. *longissimus* se

empleó para el estudio de los procesos oxidativos de la carne envasada en HiOx-MAP durante 28 días en refrigeración. Con el aumento de la dosis suplementada en la dieta, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en carne aumenta y de la misma forma, la reducción de los procesos lipídicos (TBARs) y de la formación de MetMb es más pronunciada según aumenta la dosis en la dieta y la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en carne. Sin embargo, tanto la deposición en carne como la disminución de los procesos oxidativos no tiene lugar de forma exponencial, sino que a partir de un nivel los cambios son menos acentuados y por lo tanto el beneficio/coste de la utilización de vitamina E se ve reducido. Según los autores, una concentración de  $\alpha$ -tocoferol en carne comprendida entre 1,87 y 2,37 mg/kg carne, la cual correspondería con una dosis en torno a los 250 mg acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo, mantendría los valores de TBARs y MetMb de la carne dentro de los límites de aceptabilidad durante los 28 días de conservación en HiOx-MAP.

La dosis óptima de  $\alpha$ -tocoferol en carne propuesta por Álvarez et al. (2008) corroboró los resultados obtenidos por Lauzurica, de la Fuente, Díaz, Álvarez, Pérez y Cañeque (2005) al estudiar diferentes dosis de acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo en la dieta de corderos sobre la evolución de los procesos oxidativos a lo largo de la conservación. Estos autores suplementaron la dieta de los corderos con 250 (E250), 500 (E500) o 1000 (E1000) mg acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo/kg pienso y analizaron el m. *longissimus* durante 28 días conservado en HiOx-MAP. La carne de los corderos suplementados con la dosis E250, correspondiente a un contenido de  $\alpha$ -tocoferol de 2,17 mg/carne, presentaron menor oxidación lipídica (TBARS), menor porcentaje de MetMb y una decoloración respecto del control durante toda la conservación. Una suplementación mayor en la dieta no conllevó una mejora sustancial en la calidad de la carne, ya que, aunque los valores de TBARS y el porcentaje de MetMb en el grupo E1000 fueron menores que en el grupo E250, estas diferencias no resultaron significativas. Empleando los mismos animales, Álvarez, de la Fuente, Cañeque, Lauzurica, Pérez y Díaz (2008) analizaron el perfil de ácidos grasos del m. *longissimus dorsi* y observaron que la dosis de E250 previno la oxidación de los PUFA en los lípidos totales durante los 28 días de conservación en HiOx-MAP, y el efecto de las dosis mayores sólo se apreció en la protección frente a la oxidación de los PUFA de los ácidos grasos libres.

La efectividad de suplementar vitamina E en el dieta de los corderos en dosis supranutricionales se observó también en carne con alta propensión a la oxidación mediante la incorporación de PUFA n-3. Apeleo (2016) estudió el efecto de una dieta suplementada con 300 mg acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo/kg pienso y enriquecida con 6% de semilla de lino extrusada y 1% de aceite de pescado, durante un periodo de engorde de 40 días, en la estabilidad oxidativa y la calidad organoléptica de la carne de cordero conservada 12 días en HiOx-MAP. Se observó que la carne del grupo suplementado presentó mayor estabilidad del color, con valores del índice de rojo ( $a^*$ ) y tonalidad (hue angle) estables durante la conservación y un menor porcentaje de MetMb al final de la conservación. Los procesos oxidativos en los lípidos (TBARs) fueron menores, al igual que la oxidación proteica en cuanto al contenido en grupos carbonilo aunque los grupos tiol no estuvieron afectados. La proporción de PUFA n-3 se mantuvo estable durante la conservación, lo que dio lugar a una relación n-6/n-3 más baja y, por lo tanto, más saludable desde el punto de vista nutricional. La valoración sensorial por parte de un panel entrenado resultó más aceptable en la carne de los corderos suplementados en la dieta en comparación con la carne control, obteniéndose mayor puntuación para el olor y sabor a cordero y para la ternura y valores menores en el sabor a rancio, resultando en una carne con una valoración global mayor.

Además del estudio de la dosis óptima de acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo en la dieta de los corderos para obtener una mayor vida útil de la carne, con respecto a los procesos oxidativos, se evaluó también el efecto del tiempo de suplementación. Ripoll, González-Calvo, Molino, Calvo y Joy (2013) estudiaron la suplementación de 500 mg acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo en la dieta de corderos durante tres periodos diferentes, para ver su efecto en la estabilidad oxidativa de la carne durante la conservación. Se evaluaron tres periodos de suplementación: 10 días, 20 días o 30 días antes del sacrificio. Los animales se sacrificaron con un peso entre 22 y 24 kg y una edad inferior a los 90 días y el m. *longissimus thoracis et lumborum* se utilizó para el estudio de la estabilidad oxidativa de la carne conservada durante 7 días en refrigeración. Estos autores observaron que el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en el músculo incrementó según aumentaron los días de suplementación con acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo. En relación al color, la carne de los corderos suplementados con vitamina E durante 10 d tuvieron valores de

oximioglobina,  $a^*$  y  $C^*$  mayores y valores de  $L^*$  y  $H^*$  menores que la carne de los corderos suplementados durante 20 d y 30 d, de modo que el tiempo de suplementación afectó al color inicial de la carne. Sin embargo, al final de la conservación la mayor decoloración tuvo lugar en la carne de los corderos suplementados durante 10 d. La oxidación lipídica se redujo durante toda la conservación en comparación con el control y los tres tiempos de suplementación fueron efectivos, aunque de una forma más patente cuando la suplementación se realizó durante 20 d y 30 d.

Posteriormente, se estudió el tiempo óptimo necesario de la suplementación con acetato de dl- $\alpha$ -tocoferil para obtener una mejora en la estabilidad oxidativa de la carne de cordero durante su conservación. González-Calvo, Ripoll, Molino, Calvo y Joy (2015) suplementaron la dieta de corderos con 500 mg acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo/kg pienso durante un periodo de tiempo antes del sacrificio de 4 a 28 días. Los animales empezaron el estudio a la edad de 48,7 días y un peso medio de 18,5 kg y fueron sacrificados con un peso comprendido entre 22 y 24 kg y una edad en torno a los 75 días. El m. *longissimus thoracis* se conservó durante 7 días en refrigeración para estudiar la estabilidad oxidativa en función de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el músculo. De acuerdo con los valores de oxidación lipídica (TBARs) concluyen que un contenido de  $\alpha$ -tocoferol en carne entre 0,61 y 0,90 mg/kg garantiza la conservación de la carne en condiciones aceptables (un valor de TBARs menor a 1 mg MDA/carne) durante los 7 días de conservación en refrigeración, lo cual correspondería a un periodo de suplementación antes del sacrificio de comprendido entre 7 y 14 días. Teniendo en cuenta la oxidación de los pigmento hemínicos en carne y, por lo tanto su decoloración, una suplementación de acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo en la dieta durante más de 14 días no obtuvo ninguna mejora respecto al color de la carne.

El marcado efecto antioxidante que presenta el  $\alpha$ -tocoferol cuando es depositado en los tejidos a través de la alimentación de los animales, lleva a que una de las funciones actuales en investigación sea su uso como control positivo cuando se quieren estudiar nuevos posibles compuestos antioxidantes en nutrición animal. Así, por ejemplo, Guerra-Rivas et al. (2016) emplearon una dieta suplementada con 500 mg de acetato de dl- $\alpha$ -tocoferilo en la alimentación de corderos para comparar su efecto antioxidante en la carne con el efecto de una dieta suplementada con orujo del vino o con extracto de

semilla de uva. La carne (*m. longissimus thoracis et lumborum*) se envasó en HiOx-MAP y se conservó durante 14 días en refrigeración. Claramente, la suplementación en la dieta con vitamina E originó carne más estable durante la conservación, presentando un valor de rojo ( $a^*$ ) más alto, menor formación de MetMb y menor intensidad de la oxidación lipídica (medida en TBARs), lo cual repercutió en una mejor valoración sensorial en cuanto a la apariencia y al olor de la carne sin cocinar.

#### 2.6.4.2. Empleo de la vitamina E en producto cárnico

El empleo de la vitamina como aditivo en los productos cárnicos es menos frecuente que su uso en la alimentación de los animales, posiblemente porque sus efectos frente a los procesos oxidativos es más limitado (Liu et al., 1995). Como se revisa a continuación, la incorporación de vitamina E en los derivados cárnicos ha dado lugar a resultados muy dispares.

O'Grady, Monahan, Burke y Allen (2000) estudiaron el efecto de la adición de  $\alpha$ -tocoferol a dos niveles, 300 o 3000 mg/kg lípidos, en la estabilidad de color y la oxidación de carne de ternera picada durante su conservación. La carne fue envasada en dos tipos de atmósferas modificadas (MAP), una con alta proporción de oxígeno (80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>) y otra con baja proporción de oxígeno (20% O<sub>2</sub>: 60% N<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>) y conservada durante 10 o 7 días en refrigeración, respectivamente según el envase. La incorporación de  $\alpha$ -tocoferol no afectó a la estabilidad del índice de rojo (Hunter 'a'), el cual disminuyó durante la conservación en ambos tipos de MAP. Sin embargo, la oxidación lipídica (medida por TBARs) se redujo en la carne envasada en HiOx-MAP pero no hubo diferencias respecto al control en el envase con la menor proporción de oxígeno.

Alamed, Chaiyasit, McClements y Decker (2009) también probaron dos dosis de  $\alpha$ -tocoferol (0,05 o 0,2 mmol/kg carne) en carne de ternera picada y cocinada. Utilizando la dosis más baja, no observaron ningún efecto preventivo de la formación de TBARs durante los 4 días de conservación de la carne picada en refrigeración. Sin embargo, empleando la dosis mayor de 0,2 mmol/kg, los procesos de oxidación lipídica se redujeron en comparación con el control.

El empleo de  $\alpha$ -tocoferol acetato a las dosis de 50 o de 100 mg/kg carne no resultó

efectivo en la estabilidad de los procesos oxidativo en carne picada de ternera conservada en HiOx-MAP durante 14 días en refrigeración (Vissa y Cornforth, 2006). Los parámetro de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y hue angle no se vieron afectados de forma global durante la conservación respecto del control y los procesos oxidativos sobre los lípidos (medidos en TBARs) se incrementaron a lo largo de la conservación en la misma magnitud que el control.

Lee, Decker, Faustman y Mancini (2005) tampoco encontraron ningún efecto sobre el color (parámetros  $a^*$ ,  $b^*$  y hue angle) o la oxidación lipídica (medida en TBARs) al incorporar 0,03% (basada en el contenido en grasa) de una mezcla de isómeros de tocoferoles, a hamburguesas de ternera (15% de grasa) enriquecidas en PUFA LCh mediante la adición de aceite de pescado (500 mg/110 g carne).

En la utilización de  $\alpha$ -tocoferol también se han encontrado efectos negativos al incorporarlo a la carne. Ahn, Grün y Fernando (2002) emplearon tres dosis diferentes de  $\alpha$ -tocoferol (al 0,02%, 0,05% y 0.1%) y estudiaron su efecto sobre la estabilidad lipídica de carne de ternera picada y cocinada, conservada en refrigeración durante 3 días. Se observó que con el empleo de la dosis más baja (0,02%) se previno la oxidación lipídica durante la conservación y los valores de TBARs fueron menores que el en control a día 0, indicando un efecto durante el cocinado. Además, disminuyó la formación de los olores desagradables que se originan en los alimentos precocinados. Sin embargo, con las dosis mayores de  $\alpha$ -tocoferol (0,05% y 1,0%) la oxidación lipídica evolucionó de la misma manera que en el control durante la conservación, por lo que los autores lo asocian a un posible efecto prooxidante a altas dosis.

Botsoglou, Govaris, Ambrosiadis, Fletouris y Papageorgiou (2014) valoraron la incorporación de 50 mg  $\alpha$ -tocoferol/kg carne en la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cerdo enriquecidas en PUFA n-3 a través de la dieta (30 g aceite de semilla de lino/kg pienso) tras el cocinado y su conservación durante 9 días en refrigeración. La oxidación lipídica (contenido en MDA) y proteica (contenido en grupos carbonilo y grupos tiol) resultó menor durante toda la conservación en las hamburguesas con  $\alpha$ -tocoferol, incluso a día 0, indicando un efecto antioxidante durante el cocinado. La valoración sensorial por un panel entrenado del olor y sabor de las hamburguesas, resultó aceptable para las hamburguesas con  $\alpha$ -tocoferol pero

inaceptable para las hamburguesas control. Botsoglou, Govaris, Ambrosiadis, Fletouris y Botsoglou (2014) usaron la misma dosis de  $\alpha$ -tocoferol (50 ppm) en hamburguesas de cerdo enriquecidas en PUFA n-3 (30 g aceite de semilla de lino/kg pienso) y estudiaron su efecto en la estabilidad oxidativa de las hamburguesas crudas durante 180 días en congelación. La intensidad de la oxidación lipídica fue menor durante toda la conservación en las hamburguesas con  $\alpha$ -tocoferol. Sin embargo, su efecto en la oxidación proteica tuvo lugar en la segunda mitad de la conservación, presentando mayor contenido de grupos tioles, o al final de la misma cuando el contenido en grupos carbonilo fue menor respecto del control. Las hamburguesas control fueron valoradas como inaceptables por el panel entrenado, mientras que aquellas con el  $\alpha$ -tocoferol recibieron mayor puntuación para el olor y el sabor.

La incorporación de  $\alpha$ -tocoferol en productos cárnicos también se realiza con la intención de aportar un nutriente bioactivo con beneficios para la salud humana, además de estudiar su efecto protector durante la conservación del producto. Por ejemplo, Bolger, Brunton, Lyng y Monahan (2016) incorporaron 200 mg  $\alpha$ -tocoferol/kg en salchichas de pollo para estudiar su efecto sobre la estabilidad oxidativa del producto durante la conservación, pero también estudiaron la estabilidad del  $\alpha$ -tocoferol durante la conservación en refrigeración y tras el cocinado, por un proceso de fritura o cocinado a la parrilla. Las salchichas de pollo se conservaron durante 10 días crudas y durante 5 días cocinadas, ambas conservaciones en refrigeración. Los autores observaron que entre un 82 y un 86% del  $\alpha$ -tocoferol añadido en la formulación se mantuvo durante el procesado y el cocinado no supuso una reducción de su cantidad. En cuanto al posible efecto en la estabilidad oxidativa de las salchichas, el  $\alpha$ -tocoferol no previno la oxidación lipídica durante la conservación del producto crudo como cocinado, pero redujo la disminución del índice de rojo ( $a^*$ ) en las salchichas crudas aunque no en las cocinadas. En cuanto a la textura, medida por un análisis del perfil de textura (TPA) instrumental, no hubo diferencias en la dureza, la elasticidad, la cohesión, la gomosidad o la masticabilidad. El análisis organoléptico por un panel sensorial no resultó diferente del control en cuanto a color, aroma, sabor, textura y aceptabilidad global.



### **3. Resultados y discusión**



***Artículo 1***

***Effect of dietary supplementation with red wine extract or vitamin E, in combination with linseed and fish oil, on lamb meat quality.***

Muñoz, I., Apeleo, E., De la Fuente, J., Pérez-Santaescolástica, C., Rivas-Cañedo, A., Pérez, C., Díaz, M.T., Cañeque, V., Lauzurica, S.

Meat Science, 98 (2014), 116-123





## Effect of dietary supplementation with red wine extract or vitamin E, in combination with linseed and fish oil, on lamb meat quality



Iria Muíño <sup>a,\*</sup>, Elizabeth Apeleo <sup>b</sup>, Jesús de la Fuente <sup>b</sup>, Cristina Pérez-Santaescolástica <sup>b</sup>, Ana Rivas-Cañedo <sup>a</sup>, Concepción Pérez <sup>c</sup>, María Teresa Díaz <sup>a</sup>, Vicente Cañeque <sup>a</sup>, Sara Lauzurica <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña, km. 7, Madrid 28040, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro, s/n, Madrid 28040, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Biología (Fisiología Animal), Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro, s/n, Madrid 28040, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 June 2013

Received in revised form 6 May 2014

Accepted 13 May 2014

Available online 22 May 2014

#### Keywords:

Polyphenols

Lipid oxidation

Protein oxidation

Omega-3 fatty acids

Sensory evaluation

### ABSTRACT

Thirty lambs were assigned to the following treatments: control diet (C) rich in omega-3 fatty acids; C plus 900 ppm red wine extract (RWE), or C plus 300 ppm vitamin E (VE). Oxidative stability and sensory properties of chops stored in MAP (70% O<sub>2</sub>/30% CO<sub>2</sub>) during 12 days were evaluated. Chops from the VE group showed lower lipid oxidation ( $p < 0.001$ ) and protein carbonylation ( $p < 0.05$ ), stable omega-3 fatty acids proportions and overall liking sensory scores ( $p < 0.05$ ). Dietary RWE supplementation did not influence oxidative stability of chops, however levels of C20:5n-3 were greater ( $p < 0.05$ ) and n-6/n-3 ratio ( $p < 0.01$ ) was lower, relative to controls.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

To improve the nutritional quality of ruminant meat for the consumer, lipid supplementation of animal diets with omega-3 (*n*-3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) is an effective feed strategy to increase the proportion of PUFA in meat (Díaz et al., 2011). However, PUFA are susceptible to lipid oxidation, resulting in secondary oxidation compounds responsible for quality deterioration and rancid flavour development (Campo et al., 2006). Furthermore, the oxidation of myofibrillar proteins also has an impact on the nutritional value of meat causing the loss of essential amino acids, decreased protein digestibility, and texture deterioration (Estévez, 2011).

The use of antioxidants in animal diets is recommended to decrease oxidative processes and preserve the quality of meat and meat products, especially those enriched with *n*-3 PUFA (Díaz et al., 2011). Vitamin E ( $\alpha$ -tocopheryl acetate), an antioxidant commonly used in animal nutrition, has been previously reported to reduce lipid oxidation in lamb meat during storage (Lauzurica et al., 2005).

Recent investigations in the field of antioxidants have focused on naturally occurring compounds to satisfy consumer concern over safety and toxicity of synthetic antioxidants. Polyphenols are secondary metabolites of plants and their antioxidant potential has been widely studied, including free radical scavenging, metal chelating properties,

and their capacity to reduce lipid hydroperoxide formation (Leopoldini, Russo, & Toscano, 2011). The health benefits of polyphenols are dependent on the quantity consumed and bioavailability factors. Metabolism of polyphenols occurs via a common pathway (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004). In general, aglycones may be absorbed from the small intestine, whereas esters, glycosides, and polymers must be hydrolysed by intestinal enzymes or by the colonic microflora prior to absorption. Polyphenols and their metabolites can penetrate tissues, however their ability to accumulate within specific tissues merits further investigation (Manach et al., 2004).

The antioxidant properties of red wine have been related to polyphenolic compounds present, which are classified into the following groups: hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, stilbenes, flavanols, flavanols (such as catechins and proanthocyanidins), and anthocyanidins (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011). Previously reported studies regarding the use of red wine polyphenols in animal diets to enhance meat quality are limited. It has been reported that the addition of catechins to feedstuff had a protective effect on the quality of chicken and pork meat (Yilmaz, 2006). However, the addition of grape seed extract to porcine diets (O'Grady, Carpenter, Lynch, O'Brien, & Kerry, 2008) or supplementing cattle diets with tea catechins (O'Grady, Maher, Troy, Monoley, & Kerry, 2006a; O'Grady, Maher, Troy, Moloney, & Kerry, 2006b) did not enhance meat quality. In contrast, the use of dietary grape seed extracts (Jerónimo et al., 2012) or plant extracts (Luciano et al., 2011), rich in proanthocyanidins, showed positive results on lamb meat lipid stability. In addition, *in vitro* studies have demonstrated the

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 3474038; fax: +34 91 3572293.

E-mail address: [muino.iria@inia.es](mailto:muino.iria@inia.es) (I. Muíño).

ability of different polyphenols to prevent protein oxidation (Estévez & Heinson, 2010).

Few studies examine the effect of supplementing lamb diets with polyphenolic compounds, on lipid and protein oxidation in lamb meat, where animal diets are also enriched with *n*-3 PUFA during storage also requires examination. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of dietary supplementation with either red wine extract (RWE) or vitamin E (VE) on the oxidative stability and sensory attributes of lamb meat enriched in *n*-3 PUFA stored in high-oxygen modified atmosphere packs (MAP).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and dietary supplements

Ferrous sulphate ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), trolox, gallic acid, ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol, and fatty acid methyl ester (FAME) mixture were supplied by Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA).

Extruded linseed was obtained from Pinallet, S.A. (Cardona, Spain). Deodorised fish oil was supplied by AFANSA, S.A. (Vigo, Spain). Red wine extract (RWE) rich in polyphenols was obtained from Provinols™, Seppic, S.A. (Paris, France). According to the manufacturer's details, the RWE obtained from selected red wine produced in France, mainly consists of 7.4% flavanols (catechin, epicatechin, epicatechin 3-*O*-gallate, and proanthocyanidins B1–B4 and prodelfinidin B2 3-*O*-gallate), 0.8% phenolic acids (chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, and gallic acid) and 0.17% stilbenes (resveratrol). DL- $\alpha$ -Tocopheryl acetate (VE) was purchased by DSM Nutritional Products Iberia S.A. (Alcalá de Henares, Spain).

### 2.2. Animals and diets

Animals and diets used in this study were previously described by Rivas-Cañedo et al. (2013). Thirty weaned male Manchego breed lambs (average initial live weight of  $14.3 \pm 1.3$  kg) were randomly assigned to one of three dietary treatments ( $n = 10$ ) for  $39.8 \pm 1.6$  days before slaughter. The control (C) group was fed a basal diet rich in omega-3 fatty acids (6% extruded linseed and 1% deodorised fish oil). The ingredients, nutritional composition and fatty acid profile of the basal diet are shown in Table 1. The RWE group received the control diet plus 900 mg red wine extract/kg feed. The VE group received the control diet plus 300 mg DL- $\alpha$ -tocopheryl/kg feed.

Lambs were housed in individual pens (1 m<sup>2</sup>). Experimental diets and water were offered *ad libitum*, and barley straw was provided in 10% of the feed offered. Upon reaching a live weight of  $26.6 \pm 1.5$  kg (typical Spanish commercial slaughter weight for light lamb production), lambs were transported and slaughtered in a commercial abattoir following standard commercial EU practises.

### 2.3. Lamb meat processing and packaging

After a 24 h chilling period (4 °C), carcasses were packed separately and transported under refrigeration (2 °C) to the INIA (National Institute for Agricultural and Food Research and Technology) pilot plant for further processing. The pH at 24 h post-mortem in *M. longissimus dorsi* (LD), at the T13th rib level, was measured using a HI 9025 microcomputer portable pH metre (HANNA Instruments S.L., Guipúzcoa, Spain).

Carcasses were jointed and loins from both sides of the carcass were chopped (2 cm thick). The loin chops from the left side were directly vacuum packed in metallic polyester pouches (PET/MET + PE, Sacoliva S.L., Barcelona, Spain) of low O<sub>2</sub> permeability (<1.5 cc/m<sup>2</sup>/24 h) and low water vapour transmission rate (<1.5 mg/m<sup>2</sup>/24 h), then frozen at –20 °C until analysis, remaining as 0 day samples.

**Table 1**

Ingredients, chemical composition and fatty acid (FA) composition (% of total FA methyl esters) of the *n*-3 enriched basal diet.

	Basal diet
<i>Ingredients (g/kg)</i>	
Corn meal	194
Barley	340
Wheat	182
Soybean meal	146
Sunflower meal	38
Extruded linseed	60
Deodorised fish oil	10
Salt	5
Carbonate	20
Sodium bicarbonate	2
Mineral/vitamin premix <sup>(1)</sup>	3
<i>Chemical composition (g/kg dry matter)</i>	
Dry matter	902
Crude protein	166
Crude fat	52.6
Crude fibre	44.8
Ash	55.5
<i>Fatty acid composition (%)</i>	
C14:0	0.81
C16:0	15.5
C18:0	3.41
C18:1	18.5
C18:2 <i>n</i> -6	34.7
C18:3 <i>n</i> -3	17.6
C20:5 <i>n</i> -3	0.97
C22:5 <i>n</i> -3	0.23
C22:6 <i>n</i> -3	3.09

<sup>(1)</sup> Vitamins and minerals per g of premix: 1650 UI retinol, 330 UI cholecalciferol, 5 mg DL- $\alpha$ -tocopherol, 0.6 mg riboflavin, 2 mg ascorbic acid, 4 mg niacin, 0.002 mg cyanocobalamin, 0.18 mg vitamin K, 12.6 mg Mn, 22 mg Zn, 1 mg Cu, 0.12 mg I, 4.2 mg Fe, 0.2 mg Co, 0.03 mg Se, 50 mg Mg, and 69 mg S.

The loin chops from the right side were randomly assigned to one of two storage periods (6 or 12 days) and were packed in high-oxygen modified atmosphere packs (MAP) (70% O<sub>2</sub>/30% CO<sub>2</sub>) (EAP 20, Carbueros Metálicos S.A., Barcelona, Spain) using a packing machine (EV-15-1-CD-SC, Tecnotrip S.A., Barcelona, Spain), and stored in the dark at 4 °C. The pouches used for storage in MAP (PA/PE, Sacoliva S.L., Barcelona, Spain) were composed of 150  $\mu$ m polyamide/polyethylene (50/100), with low gas permeability (18 cc/m<sup>2</sup>/24 h O<sub>2</sub> at 23 °C, 55 cc/m<sup>2</sup>/24 h CO<sub>2</sub>, and 4.0 cc/m<sup>2</sup>/24 h at 23 °C) and low water vapour transmission rate (1.8 g/m<sup>2</sup>/24 h at 23 °C and 85% relative humidity).

After the storage period, loin chops were vacuum packaged and frozen, until required for analysis. The LD muscle from triplicate loin chops from each animal was dissected, diced into 1 cm<sup>3</sup> portions and freeze-dried in a Cryodos 50 freeze-dryer (Telstar S.A., Madrid, Spain) for analysis of total phenol content, protein oxidation and fatty acid composition.

### 2.4. In vitro antioxidant activity of RWE and LD muscle

The total reducing potential of the RWE was assayed by ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assays.

The FRAP assay was performed in quadruplicate. RWE (0.75 g) was homogenised for 2 min at 9000 rpm using a DI 25 basic homogeniser (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) in 10 mL of 75 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). Homogenates were centrifuged (Universal 32R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) at 5000 rpm for 15 min and supernatants were filtered (FILTER-LAB® 1242, Filtros Anoa S.A., Barcelona, Spain) and collected. The antioxidant capacity of the supernatant obtained was determined following the method described by Benzie and Strain (1996). The FRAP activity of samples was calculated using a ferrous sulphate ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) standard

curve (100–1000  $\mu\text{M}$ ) and results were expressed as  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  equivalents/g RWE.

The DPPH assay was performed in quadruplicate. RWE (0.25 g) was homogenised in 10 mL of methanol for 1 min at 9000 rpm. Samples were centrifuged for 10 min at 5500 rpm and the supernatants were filtered (FILTER-LAB® 1242, Filtros Anioia S.A., Barcelona, Spain). The antioxidant capacity of supernatant was performed following the Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) method. Absorbance of the extracts at 517 nm wavelength was recorded (UV-160A, Shimadzu, Duisburg, Germany) immediately ( $A_i$ ) and after 30 min of incubation at 37 °C ( $A_f$ ). The percentage of inhibition (Inhib. %) of the DPPH $\cdot$  radical was calculated as:

$$\text{Inhib. \%} = [(A_i - A_f) / A_i] \times 100$$

Solutions of known concentration of trolox (10–100  $\mu\text{M}$ ) were used as a reference to compare the antioxidant activity of RWE. The results were expressed as  $\mu\text{mol trolox equivalents/g RWE}$ .

The total phenol content (TPC) of RWE, in quadruplicate, and LD muscle, in triplicate, was performed following the method of Singleton and Rossi (1965) with some modifications. RWE (0.5 g) or freeze-dried LD muscle (1 g) was extracted with 10 mL of aqueous solution of methanol (50/50; v/v) at room temperature for 3 h in an orbital shaker at 200 rpm and the mixture was left to stand for 24 h at 4 °C. The extracts were subsequently centrifuged at 9000 rpm for 10 min and 100  $\mu\text{L}$  of supernatant was mixed with 2.25 mL of distilled water, 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (previously diluted 5-fold with distilled water, v/v) and 0.75 mL of sodium carbonate solution (70 g/L in distilled water, w/v). After 8 min, 900  $\mu\text{L}$  of distilled water was added and samples were held at 50 °C in a water bath for 10 min. Absorbance of the extracts were measured spectrophotometrically at 765 nm wavelength against a blank containing all assay reagents. The TPC of RWE and LD muscle was quantified using a gallic acid standard curve (0–100  $\mu\text{g/mL}$ ). Results were expressed as  $\mu\text{g gallic acid equivalents (GAE)/g RWE}$  or muscle.

### 2.5. LD muscle $\alpha$ -tocopherol content

The concentration of  $\alpha$ -tocopherol was determined in duplicate, following the method of Cayuela, Garrido, Bañón, and Ros (2003).  $\alpha$ -Tocopherol (50  $\mu\text{L}$ ) was injected in a high performance liquid chromatograph (HPLC) with fluorescence detector (Perkin Elmer Series 200, Shelton, USA) equipped with a silica column (150  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  particle size) and a silica analytical guard cartridge holder (3 mm, 5  $\mu\text{m}$  particle size) (ACE-127-1546 and ACE 127-0103GD, respectively, ACE HPLC columns, Scotland). The mobile phase comprised a mix of isooctane and tetrahydrofuran (both HPLC grade), the following was established: 98:2 v/v for 5 min, 97:3 v/v for 10 min, and 98:2 v/v for 10 min. Throughout the process, there was a constant flow of 1.1 mL/min. Fluorescence detection was carried out at 297 and 321 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. Quantification was performed by means of a calibration curve of ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol standards (0.2–1  $\mu\text{g/mL}$ ). Results were expressed as  $\mu\text{g } \alpha$ -tocopherol/g muscle.

### 2.6. Measurement of lipid oxidation by TBARS

Lipid oxidation, assessed as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) value, was determined in duplicate over the storage period (on days 0, 6 and 12) in LD muscle, according to the method described by Maraschiello, Sárraga, and García Regueiro (1999). Results were expressed as mg malonaldehyde (MDA)/kg muscle.

### 2.7. Determination of protein carbonyl groups by the DNPH method

Total carbonyl groups were determined in triplicate on day 0 and after days 6 and 12 of storage. Freeze-dried LD muscle (25 mg) was weighed and 10 mL of 10 mM phosphate buffer containing 0.6 N NaCl

(pH 6.0) was added. Samples were mixed in an orbital shaker set at slow speed (approximately 30 rpm) for 2 h and left to stand overnight in refrigeration (4 °C). Afterwards, the protein carbonyl groups in the samples were determined following the procedure proposed by Ganhão, Morcuende, and Estévez (2010). Results were expressed as nmol of carbonyl groups/mg protein.

### 2.8. Fatty acid analysis of feedstuffs and LD muscle

Fatty acid methyl esters (FAMES) of the feed were performed in duplicate, following the method described by Sukhija and Palmquist (1988). FAMES of freeze-dried LD muscle on days 0, 6 and 12 were formed in duplicate according to the method proposed by Lee, Tweed, Kim, and Scollan (2012). The final organic layers with the FAMES were transferred to a 2 mL vial, then capped and stored at –20 °C until analysis.

FAMES from feed and LD muscle were analysed by gas chromatography with flame ionisation detection (Perkin-Elmer Autosystem-1:A, Massachusetts, USA). Separation was carried out in an Omegawax™ 320 capillary column (30 m  $\times$  0.32 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) with polyethylene glycol as a stationary phase (Supelco, Bellefonte, USA). Samples were injected (1.0  $\mu\text{L}$ ) in the split mode at a 1:50 split ratio with helium as the carrier gas at a constant flow of 9 psig. The detector and injector oven temperatures were set at 255 °C and 250 °C, respectively. The temperature profile of the oven was 150 °C for 1 min, which increased by 6 °C/min to 190 °C. The temperature continued to increase by 1 °C/min to 210 °C and held for 23 min. Individual FAMES were identified by comparing their retention times with those from a standard FAME mixture. Results were expressed as a percentage of the total FAMES.

### 2.9. Sensory evaluation of cooked LD loin chops

Sensory evaluation was performed in meat samples from day 0 and after 6 days of storage, by an eight-member sensory panel. Panellists were trained in the sensory profiling of lamb meat over 10 training sessions. They received additional training in the assessment of specific lamb, fat and oxidised odour and flavour, according to Gasperi, Biasioli, Gallerani, Fasoli, and Piasentier (2005). In addition, the sensory panel was trained to assess fish odour and flavour, using four samples of minced lamb meat with added fish oil at four different concentrations (0%, 0.05%, 0.1%, and 0.2%).

LD muscle samples were thawed overnight at 4 °C, wrapped in aluminium foil and cooked in a pre-heated domestic oven (XF0303-TG, Unox, Vigodarzere, Italy) at 175 °C, until an internal temperature of 70 °C was reached. The temperature was measured by a thermocouple probe (K-type thermocouple) inserted into the centre of each chop. Following cooking, fat and visible connective tissue was removed and LD muscle was cut into blocks of approximately 2  $\text{cm}^3$ . Cooked LD samples were wrapped in aluminium foil, labelled with a single random three-digit code and placed in a heated incubator. Panellists assessed six samples per session, the two storage periods (0 and 6 days) for each of the three dietary treatments, using an unstructured 100-mm line scale, anchored at each end. The sensory descriptors assessed by the panellists were odour (lamb, rancid, fish), flavour (lamb, fatty, rancid, fish), texture (tenderness, juiciness) and overall liking. Samples were evaluated under red light conditions. The panel members were given unsalted bread and water at room temperature to cleanse their palate between samples.

### 2.10. Statistical analysis

Data were analysed using the 9.1.2 Statistical Analysis System package (SAS Institute, Cary, USA.). One-way analysis of variance was performed for pH data and for  $\alpha$ -tocopherol and total polyphenols content in LD muscle using GLM procedure; dietary treatment was used as main factor. TBARS values, protein carbonyl content, fatty acid

composition and sensory analysis were analysed as a repeated measures design using the MIXED procedure. A split-plot design was performed considering the dietary treatment as a main plot effect and the storage period, a repeated measure, as a subplot effect. For the sensory analysis, the effect of the panellist and the session were included in the design. Each animal was considered to be one experimental unit. In repeated measures analyses, different covariance matrixes were evaluated on the basis of the lowest Bayesian Information Criterion. A Dunn-Šidak test was performed for mean comparisons ( $p < 0.05$ ) when significant differences were observed amongst main factors and when the interaction between both factors (dietary treatment  $\times$  storage period) was significant. All results are presented as mean values  $\pm$  standard error.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Total phenol content and in vitro radical scavenging activity of RWE

The total phenol content (TPC) of RWE was 550 mg GAE/g extract. The FRAP and DPPH radical scavenging activities of RWE were 58,231 mM Fe<sup>2+</sup> equivalents/g extract and 10,724  $\mu$ M trolox equivalents/g extract, respectively. The level of polyphenolic compounds and, therefore, the antioxidant capacity of red wine are highly variable due to differences in the source of grape variety and differences in the winemaking technology (Rodrigo et al., 2011), making these values difficult to compare to others previously published in the scientific literature. Moreover, few studies reported the TPC and antioxidant activity of the polyphenolic extracts under evaluation. Gladine, Rock, Morand, Bauchart, and Durand (2007) reported a feeding trial carried out using a grape extract whose TPC and DPPH radical scavenging activity was 651 mg GAE/g of extract and 6630  $\mu$ M of trolox equivalents/g of extract, respectively, being data very similar to the characteristics shown by the RWE in the present study.

#### 3.2. LD muscle $\alpha$ -tocopherol content, total phenol content and pH

Levels of  $\alpha$ -tocopherol and the TPC and the pH at 24 h in LD muscle from each dietary treatment on day 0 are presented in Table 2. The  $\alpha$ -tocopherol content was influenced by dietary treatment, where the  $\alpha$ -tocopherol content of LD muscle from the VE group ( $2.42 \pm 0.24$   $\mu$ g  $\alpha$ -tocopherol/g) was over 2-fold higher than LD muscle from the C and RWE groups. Results agree with those of Álvarez et al. (2008), who reported 2.17  $\mu$ g  $\alpha$ -tocopherol/g LD muscle when lamb diets were supplemented with 270 ppm of DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate.

Studies regarding the effect of dietary supplementation with polyphenolic compounds on the presence and concentration of phenolic compounds in animal tissue are limited. In the present study, no differences existed between dietary treatments, showing an average value of  $242 \pm 5.1$   $\mu$ g GAE/g LD muscle (Table 2). Similarly, López-Andrés et al. (2013) did not report any differences in plasma and liver from lambs fed quebracho-supplement diet (rich in proanthocyanidins) compared to controls.

In contrast to the results reported in the present study, Luciano et al. (2011) found higher concentrations of total polyphenols in lamb meat from animals fed a diet supplemented with 8.96% DM of quebracho

(*Schinopsis lorentzii*) extract (rich in proanthocyanidins) compared to the control diet (1.31 vs. 0.90 mg tannic acid equivalents/g LD muscle) during a 60 day fattening period. Similarly, Qwele et al. (2013) reported that meat from goats fed a supplemented diet rich in proanthocyanidins (200 g/animal/day of dried *Moringa oleifera* leaves) had a higher concentration of total phenols than meat from goats fed the control diet (1.62 and 1.48 mg gallic acid/g LD muscle, respectively).

It is important to note that the Folin-Ciocalteu method is not exclusively specific for phenolic compounds and other substances such as ascorbic acid, amino acids, sugars, inorganic salts, and citric acid, which can interfere with the analysis and overestimate the content of phenolic compounds (Berker, Olgun, Ozyurt, Demirata, & Apak, 2013) which should be carefully interpreted.

The muscle pH at 24 h reported in this study is comparable to previously reported values in lamb (Lauzurica et al., 2005) and was unaffected by dietary supplementation.

#### 3.3. Lipid and protein oxidation in LD muscle

Lipid and protein oxidation in LD muscle over the 12 day storage period are presented in Figs. 1 and 2, respectively. An interaction between dietary treatment and storage period was observed for lipid oxidation (TBARS) values ( $p < 0.001$ ). No significant differences between treatments were observed at the beginning of the storage period (day 0). However, from day 6 onwards, LD muscle from the C and RWE groups showed TBARS values higher than the acceptability limit of 2 mg of MDA/kg of meat, used as a marker for the development of rancid off-flavours in meat (Campo et al., 2006). In contrast, LD muscle from the VE group did not reach this limit over the 12 day storage period.

Dietary RWE, hence, did not exert an antioxidant effect in lamb meat. Similarly, Brogna et al. (2014) reported no effect on lipid oxidation in lamb meat over 12 days of refrigerated storage when animal diets were supplemented with proanthocyanidin-rich extract from quebracho tree (80 g/kg). Luciano et al. (2009) also reported no antioxidant effect of dietary quebracho extract (8.9% DM) rich in proanthocyanidins on TBARS values of lamb meat stored in high-oxygen MAP over 14 days. The authors suggested that differences in the susceptibility to lipid oxidation were not detected by the TBARS test used in the study. In support of this theory, recent findings reported by our research group (Rivas-Cañedo et al., 2013) regarding the volatile profile of the lamb meat demonstrated a protective effect of dietary RWE supplementation against lipid oxidation. The behaviour of selected compounds, such as octane and nonane throughout storage, showed that RWE supplementation was less efficient in delaying lipid oxidation than VE supplementation, but more effective than the control diet (without any antioxidants added).

Similar to our results regarding TBARS values, O'Grady et al. (2006a and 2006b) and O'Grady, Maher, Troy, Moloney, & Kerry (2006b) observed that the supplementation of beef cattle diets with tea catechins (1000 to 10,000 mg/animal/day) did not improve the lipid stability of beef meat stored in high-oxygen MAP for up to 8 days. Nevertheless, Jerónimo et al. (2012) reported that the inclusion of grape seed extract containing 95% proanthocyanidins at a level of 2.5% DM in lamb diets

**Table 2**

$\alpha$ -Tocopherol concentration, total phenol content and pH values of n-3 enriched LD muscle from lambs fed on diet containing different supplements: control (C), red wine extract (RWE), and vitamin E (VE).

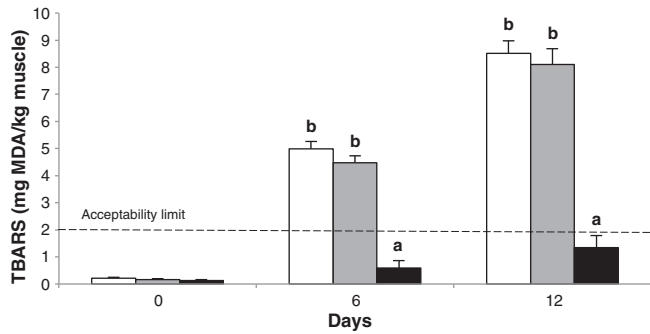
	Dietary treatment			Significance <sup>(1)</sup>
	C	RWE	VE	
$\alpha$ -Tocopherol ( $\mu$ g/g muscle)	$1.07 \pm 0.07^a$	$1.01 \pm 0.05^a$	$2.42 \pm 0.24^b$	***
Polyphenols ( $\mu$ g GAE <sup>(2)</sup> /g muscle)	$237 \pm 9$	$246 \pm 9$	$244 \pm 9$	ns
pH at 24 h	$5.58 \pm 0.03$	$5.54 \pm 0.03$	$5.59 \pm 0.03$	ns

<sup>a,b</sup>Different superscript letters within the same row indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

Data without superscripts indicate no significant differences ( $p > 0.05$ ).

<sup>(1)</sup> ns,  $p > 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

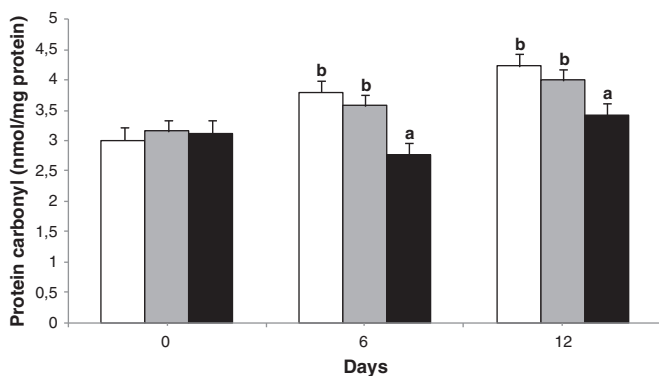
<sup>(2)</sup> Gallic acid equivalent.



**Fig. 1.** Lipid oxidation (TBARS) values (mg MDA/kg of muscle) of *n*-3 enriched meat from lambs fed on diet containing different supplements: □ control (C), ■ red wine extract (RWE), and ■ vitamin E (VE), and stored in MAP (70% O<sub>2</sub>/30% CO<sub>2</sub>) over 12 days at 4 °C. Different letters mean significant differences ( $p < 0.05$ ) between dietary supplementations within the each storage day. The error bars represent standard error.

resulted in a reduction of lipid oxidation, after induction of oxidation *in vitro*, in meat stored in aerobic conditions over 7 days. However, TBARS values exceeded the acceptability limit (2 mg MDA/kg meat) from day 3 of storage period, probably due to the inclusion of PUFA (sunflower and linseed oils) in lamb diets, leading to meat with a higher susceptibility to oxidation.

In relation to protein oxidation, an interaction between dietary treatment and storage period was also observed ( $p < 0.05$ ). The protein oxidation values were not significantly different amongst treatments on day 0. Nevertheless, after 6 and 12 days of storage, LD muscle from the VE group showed lower carbonyl groups content than the C and RWE groups. The role of oxidising lipids in the initiation of protein oxidation in muscle foods has been the subject of considerable discussion, where it is not clear whether lipid oxidation initiates protein oxidation or *vice versa*, or if the two types of oxidation are coupled (Lund, Heinonen, Baron, & Estévez, 2011). In the present study, dietary RWE supplementation did not delay protein or lipid oxidation; however both processes were prevented by dietary VE supplementation. It seems that the lower amount of carbonyl groups found in LD muscle from the VE group could be due to the lower formation of lipid oxidation compounds, since the amino acids residues studied by the DNPH method (i.e. lysine and arginine) (Estévez, 2011) are commonly targets of reactive oxygen substances generated via lipid oxidation (Lund, Heinonen, Baron, & Estévez, 2011). A protective effect of some polyphenolic compounds present in the RWE (namely, catechin, gallic acid and chlorogenic acid) on the formation of protein carbonyls has been observed *in vitro* (Estévez & Heinonen, 2010). To date, no other studies have examined



**Fig. 2.** Protein carbonyl concentration (nmol/mg protein) of *n*-3 enriched meat from lambs fed on diet containing different supplements: □ control (C), ■ red wine extract (RWE), and ■ vitamin E (VE), and stored in MAP (70% O<sub>2</sub>/30% CO<sub>2</sub>) over 12 days at 4 °C. Different letters mean significant differences ( $p < 0.05$ ) between dietary supplementations within the each storage day. The error bars represent standard error.

the effect of dietary red wine polyphenols on the protein stability of meat from ruminant animals.

### 3.4. Fatty acid composition of LD muscle

The fatty acid composition of LD muscle from each dietary treatment is presented in Table 3. The proportion of eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5*n*-3) resulted higher in LD muscle from the RWE group than in the C group, and the highest proportion of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6*n*-3) was observed in LD muscle from the VE group, followed by the RWE group. Moreover, LD muscle from the RWE group had intermediate proportions of docosapentaenoic acid (DPA, C22:5*n*-3) and long-chain *n*-3 fatty acids (LCH*n*-3) on day 12 of storage, with the highest in the VE group and the lowest in the C group. These results cannot be attributed to some antioxidant effect of the red wine polyphenols during the storage period, due to the fact the proportion of these fatty acids decreased during this period, which is in concordance with the results reported regarding the levels of lipid oxidation in LD muscle from the RWE group (Fig. 1). According to our knowledge, no other studies are available regarding the effect of dietary red wine polyphenols on the fatty acid composition of meat during storage. These results might be possible as a consequence of a higher numerical content of the aforementioned fatty acids at the beginning of storage period in LD muscle from the RWE group resulting in a significantly lower *n*-6/*n*-3 ratio in the RWE group compared with meat from the C group. In fact, Vasta et al. (2009) reported a greater total PUFA in the muscle of proanthocyanidin-supplemented lambs (4.7% DM basis of proanthocyanidins) compared with muscle from animals that did not receive supplemental dietary proanthocyanidins.

In contrast, the *n*-3 PUFA proportions showed stable values over the storage period in LD muscle from the VE group, showing the antioxidant capacity of dietary VE supplementation on fatty acid composition. These findings agree with those reported by Álvarez et al. (2009) in lamb meat storage in high-oxygen MAP over 28 days when the animals were fed a vitamin E-enriched diet (0, 250, 500, and 1000 ppm).

### 3.5. Sensory evaluation of cooked LD loin chops over storage period

Results from the sensory analysis of cooked LD muscle throughout the storage period are presented in Table 4. An interaction between dietary treatment and storage period was observed on lamb, rancid and fish both odour and flavour, and on overall liking. There were no significant differences on any attributes studied between dietary treatments on day 0 of storage. Similarly, Jerónimo et al. (2012) reported that the consumer panel did not detect the effect of the grape seed extract included in lamb diets at level of 2.5% DM. However, on day 6 of storage, LD muscle from the C and RWE groups showed lower scores for lamb odour and flavour, and for overall liking descriptors, along with higher scores for rancid and fish both odour and flavour descriptors. LD muscle from the VE group showed no decrease in these sensory attributes over storage period, obtaining the best overall liking. These findings agree with those obtained for the TBARS values (Fig. 1) where values above the acceptability limit (2 mg of MDA/kg of meat) (Campo et al., 2006) from which the rancid flavour is detected were found in LD muscle from the C and RWE groups. Similarly, the inclusion of 1000 ppm of tea catechins in the cattle diet did not result in a significant improvement in the odour or flavour of cooked beef, relative to the control samples (O'Grady, Maher, Troy, Moloney, et al., 2006).

Regarding texture, there was an interaction between dietary treatment and storage period on tenderness, in which scores increased in VE group over storage period, remaining unchanged in the C and RWE groups. The improvement of meat tenderness is related with the activation of  $\mu$ -calpain and *m*-calpain enzymes, responsible for post-mortem proteolysis. However, these enzymes are particularly susceptible to oxidation, leading to inactivation or modification of their activity (Huff-Lonergan, Zhang, & Lonergan, 2010). Therefore, increasing the level of

**Table 3**Fatty acid composition (%) of *n*-3 enriched LD muscle from lambs fed on diet containing different supplements: control (C), red wine extract (RWE), and vitamin E (VE), in relation to storage period (SP).

	SP days	Dietary treatments (DT)			Mean	Significance <sup>(1)</sup>		
		C	RWE	VE		DT	SP	DT × SP
C18:0	0	11.0 ± 0.3 <sup>y</sup>	10.8 ± 0.2 <sup>y</sup>	11.3 ± 0.3 <sup>x</sup>	11.0 ± 0.2	ns	***	**
	6	11.4 ± 0.3 <sup>xy</sup>	11.2 ± 0.3 <sup>xy</sup>	11.3 ± 0.3 <sup>x</sup>	11.3 ± 0.2			
	12	11.8 ± 0.3 <sup>x</sup>	11.4 ± 0.3 <sup>x</sup>	11.3 ± 0.3 <sup>x</sup>	11.5 ± 0.2			
Mean		11.4 ± 0.3	11.1 ± 0.3	11.3 ± 0.3				
C18:1 <sup>(2)</sup>	0	41.8 ± 0.9	40.6 ± 0.9	39.1 ± 0.9	40.5 ± 0.5	**	ns	ns
	6	41.9 ± 0.9	40.4 ± 0.9	39.0 ± 0.9	40.4 ± 0.5			
	12	43.3 ± 0.9	42.1 ± 0.9	39.5 ± 0.9	41.6 ± 0.5			
Mean		42.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	41.0 ± 0.5 <sup>ab</sup>	39.2 ± 0.5 <sup>b</sup>				
C18:2n-6	0	8.92 ± 0.93	8.98 ± 0.88	9.36 ± 0.93	9.09 ± 0.53 <sup>x</sup>	ns	**	ns
	6	8.84 ± 0.83	9.05 ± 0.79	9.15 ± 0.83	9.01 ± 0.47 <sup>x</sup>			
	12	7.81 ± 0.70	7.85 ± 0.66	8.69 ± 0.70	8.12 ± 0.40 <sup>y</sup>			
Mean		8.52 ± 0.78	8.63 ± 0.74	9.07 ± 0.78				
C18:3n-3	0	1.20 ± 0.12 <sup>x</sup>	1.37 ± 0.11 <sup>xy</sup>	1.10 ± 0.12 <sup>y</sup>	1.22 ± 0.07	ns	***	**
	6	1.22 ± 0.11 <sup>x</sup>	1.44 ± 0.11 <sup>x</sup>	1.22 ± 0.11 <sup>x</sup>	1.29 ± 0.06			
	12	1.06 ± 0.11 <sup>y</sup>	1.28 ± 0.11 <sup>y</sup>	1.21 ± 0.11 <sup>xy</sup>	1.18 ± 0.06			
Mean		1.16 ± 0.11	1.36 ± 0.11	1.18 ± 0.11				
C20:5n-3	0	0.80 ± 0.10	1.08 ± 0.10	0.85 ± 0.10	0.91 ± 0.06 <sup>x</sup>	*	**	ns
	6	0.62 ± 0.10	0.88 ± 0.10	0.84 ± 0.10	0.78 ± 0.06 <sup>xy</sup>			
	12	0.42 ± 0.10	0.62 ± 0.10	0.79 ± 0.10	0.61 ± 0.06 <sup>y</sup>			
Mean		0.61 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.86 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.06 <sup>ab</sup>				
C22:5n-3	0	0.70 ± 0.06 <sup>a,x</sup>	0.82 ± 0.06 <sup>a,x</sup>	0.74 ± 0.06 <sup>a,x</sup>	0.75 ± 0.04	ns	***	*
	6	0.55 ± 0.06 <sup>a,y</sup>	0.67 ± 0.05 <sup>a,y</sup>	0.68 ± 0.06 <sup>a,x</sup>	0.64 ± 0.03			
	12	0.40 ± 0.06 <sup>b,z</sup>	0.50 ± 0.06 <sup>ab,z</sup>	0.67 ± 0.06 <sup>a,x</sup>	0.52 ± 0.03			
Mean		0.55 ± 0.05	0.66 ± 0.05	0.70 ± 0.05				
C22:6n-3	0	1.49 ± 0.13	1.77 ± 0.12	1.59 ± 0.13	1.62 ± 0.07 <sup>x</sup>	**	***	ns
	6	1.11 ± 0.13	1.36 ± 0.12	1.45 ± 0.13	1.30 ± 0.07 <sup>y</sup>			
	12	0.75 ± 0.13	0.93 ± 0.12	1.39 ± 0.13	1.02 ± 0.07 <sup>z</sup>			
Mean		1.12 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.35 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.48 ± 0.07 <sup>a</sup>				
SFA	0	38.8 ± 0.8	39.2 ± 0.8	40.6 ± 0.8	39.5 ± 0.5 <sup>y</sup>	ns	*	ns
	6	40.0 ± 0.8	40.3 ± 0.8	41.1 ± 0.8	40.5 ± 0.5 <sup>xy</sup>			
	12	41.2 ± 0.8	41.7 ± 0.8	41.4 ± 0.8	41.5 ± 0.5 <sup>x</sup>			
Mean		40.0 ± 0.5	40.4 ± 0.4	41.1 ± 0.5				
MUFA	0	44.5 ± 1.0	43.3 ± 0.9	41.8 ± 1.0	43.2 ± 0.6	**	ns	ns
	6	44.6 ± 1.0	43.1 ± 0.9	41.7 ± 1.0	43.1 ± 0.6			
	12	46.1 ± 1.0	44.9 ± 0.9	42.3 ± 1.0	44.4 ± 0.6			
Mean		45.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	43.7 ± 0.6 <sup>ab</sup>	41.9 ± 0.6 <sup>b</sup>				
PUFA	0	16.7 ± 1.4	17.6 ± 1.3	14.6 ± 1.4	17.3 ± 0.8 <sup>x</sup>	ns	*	ns
	6	15.4 ± 1.4	15.6 ± 1.3	17.1 ± 1.4	16.4 ± 0.8 <sup>xy</sup>			
	12	12.7 ± 1.4	13.5 ± 1.3	16.3 ± 1.4	14.1 ± 0.8 <sup>y</sup>			
Mean		14.9 ± 0.8	15.9 ± 0.8	17.0 ± 0.8				
<i>n</i> -3 <sup>(3)</sup>	0	4.19 ± 0.36 <sup>x</sup>	5.03 ± 0.34 <sup>x</sup>	4.29 ± 0.36 <sup>x</sup>	4.50 ± 0.21	ns	***	***
	6	3.50 ± 0.36 <sup>y</sup>	4.35 ± 0.34 <sup>y</sup>	4.18 ± 0.36 <sup>x</sup>	4.01 ± 0.21			
	12	2.63 ± 0.36 <sup>z</sup>	3.32 ± 0.34 <sup>z</sup>	4.06 ± 0.36 <sup>x</sup>	3.34 ± 0.21			
Mean		3.44 ± 0.35	4.23 ± 0.33	4.18 ± 0.35				
LCHn-3 <sup>(4)</sup>	0	2.98 ± 0.27 <sup>a,x</sup>	3.67 ± 0.25 <sup>a,x</sup>	3.19 ± 0.27 <sup>a,x</sup>	3.28 ± 0.15	ns	***	***
	6	2.28 ± 0.27 <sup>a,y</sup>	2.91 ± 0.25 <sup>a,y</sup>	2.97 ± 0.27 <sup>a,x</sup>	2.72 ± 0.15			
	12	1.57 ± 0.27 <sup>b,z</sup>	2.04 ± 0.25 <sup>ab,z</sup>	2.86 ± 0.27 <sup>a,x</sup>	2.16 ± 0.15			
Mean		2.28 ± 0.25	2.87 ± 0.24	3.0 ± 0.25				
<i>n</i> -6 <sup>(5)</sup>	0	12.4 ± 1.2	12.4 ± 1.1	13.1 ± 1.2	12.6 ± 0.7 <sup>x</sup>	ns	***	ns
	6	11.7 ± 1.1	12.1 ± 1.1	12.7 ± 1.1	12.2 ± 0.6 <sup>x</sup>			
	12	9.88 ± 0.91	10.0 ± 0.9	12.0 ± 0.9	10.6 ± 0.5 <sup>y</sup>			
Mean		11.3 ± 1.0	11.5 ± 1.0	12.6 ± 1.0				
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	0	3.10 ± 0.22	2.47 ± 0.21	3.11 ± 0.22	2.90 ± 0.12	**	ns	ns
	6	3.45 ± 0.22	2.78 ± 0.21	3.06 ± 0.22	3.10 ± 0.12			
	12	3.92 ± 0.22	3.04 ± 0.21	2.99 ± 0.22	3.32 ± 0.22			
Mean		3.49 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.76 ± 0.12 <sup>b</sup>	3.05 ± 0.12 <sup>ab</sup>				

<sup>a,b</sup>Different superscript letters within the same row indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).<sup>x,y,z</sup>Different superscript letters within the same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).Data without superscripts indicate no significant differences ( $p > 0.05$ ).

SFA, sum of saturated fatty acids; MUFA, sum of monounsaturated fatty acids; PUFA, sum of polyunsaturated fatty acids.

<sup>(1)</sup> ns,  $p > 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .<sup>(2)</sup> Sum of all *cis* and *trans* isomers.<sup>(3)</sup> *n*-3 = C18:3n-3 + C20:5n-3 + C22:5n-3 + C22:6n-3.<sup>(4)</sup> Long-chain *n*-3 fatty acids = C20:5n-3 + C22:5n-3 + C22:6n-3.<sup>(5)</sup> *n*-6 = C18:2n-6 + C20:2n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6.

antioxidants in meat such as  $\alpha$ -tocopherol could protect these endogenous proteases against the oxidation resulting in an improvement in meat tenderness. This result can be related with results obtained regarding protein oxidation (Fig. 2), where the meat from VE group showed the lowest protein carbonyl formation.

### 3.6. The lack of an effect of dietary RWE supplementation: possible causes

A number of factors may be responsible for the lack of an effect of dietary RWE on the oxidative stability of lamb meat. The level of inclusion of RWE in animal diets and/or the fattening period might need to be

**Table 4**  
Sensory evaluation of *n*-3 enriched LD muscle from lambs fed on diet containing different supplements: control (C), red wine extract (RWE), and vitamin E (VE), in relation to storage period (SP).

	SP Days	Dietary treatment (DT)			Mean	Significance <sup>(1)</sup>		
		C	RWE	VE		DT	SP	DT x SP
<b>Odour</b>								
Lamb	0	55.1 ± 2.1 <sup>a,x</sup>	56.1 ± 2.0 <sup>a,x</sup>	55.9 ± 2.1 <sup>a,x</sup>	55.7 ± 1.2	***	***	***
	6	25.3 ± 1.8 <sup>a,y</sup>	29.0 ± 1.7 <sup>a,y</sup>	54.2 ± 1.8 <sup>b,x</sup>	36.1 ± 1.0			
Mean		40.2 ± 1.4	42.5 ± 1.3	55.0 ± 1.4				
Rancid	0	3.16 ± 0.86 <sup>a,x</sup>	4.54 ± 0.81 <sup>a,x</sup>	2.42 ± 0.86 <sup>a,x</sup>	3.37 ± 0.49	***	***	***
	6	16.9 ± 1.1 <sup>a,y</sup>	15.9 ± 1.1 <sup>a,y</sup>	3.45 ± 1.13 <sup>b,x</sup>	12.1 ± 0.7			
Mean		10.1 ± 0.7	10.2 ± 0.7	2.94 ± 0.71				
Fish	0	1.89 ± 1.29 <sup>a,x</sup>	6.14 ± 1.24 <sup>a,x</sup>	3.60 ± 1.33 <sup>a,x</sup>	3.88 ± 0.74	***	***	***
	6	58.1 ± 2.5 <sup>a,y</sup>	48.4 ± 2.3 <sup>a,y</sup>	4.92 ± 2.45 <sup>b,x</sup>	37.1 ± 1.4			
Mean		30.0 ± 1.4	27.3 ± 1.3	4.26 ± 1.40				
<b>Texture</b>								
Tenderness	0	53.8 ± 3.5 <sup>x</sup>	54.6 ± 3.4 <sup>x</sup>	49.6 ± 3.5 <sup>x</sup>	52.6 ± 2.0	ns	***	*
	6	60.3 ± 3.5 <sup>x</sup>	60.5 ± 3.4 <sup>x</sup>	67.4 ± 3.5 <sup>y</sup>	62.8 ± 2.0			
Mean		57.0 ± 3.2	57.6 ± 3.1	58.5 ± 3.2				
Juiciness	0	54.5 ± 2.2	50.4 ± 2.1	50.7 ± 2.2	51.9 ± 1.2	ns	ns	ns
	6	50.5 ± 2.0	51.8 ± 1.9	53.2 ± 1.6	51.8 ± 1.1			
Mean		52.5 ± 1.5	51.1 ± 1.4	52.0 ± 1.5				
<b>Flavour</b>								
Lamb	0	48.7 ± 2.1 <sup>a,x</sup>	45.8 ± 2.0 <sup>a,x</sup>	47.6 ± 2.1 <sup>a,x</sup>	47.4 ± 1.2	***	***	***
	6	20.5 ± 1.7 <sup>a,y</sup>	22.2 ± 1.7 <sup>a,y</sup>	42.5 ± 1.7 <sup>b,x</sup>	28.4 ± 1.0			
Mean		34.6 ± 1.4	34.0 ± 1.3	45.1 ± 1.4				
Fatty	0	7.23 ± 1.21	10.3 ± 1.1	8.40 ± 1.22	8.65 ± 0.69	ns	ns	ns
	6	6.38 ± 1.07	6.39 ± 1.02	7.72 ± 1.07	6.83 ± 0.61			
Mean		6.80 ± 0.82	8.35 ± 0.78	8.06 ± 0.83				
Rancid	0	2.44 ± 1.14 <sup>a,x</sup>	4.99 ± 1.09 <sup>a,x</sup>	1.73 ± 1.13 <sup>a,x</sup>	3.05 ± 0.65	***	***	**
	6	17.6 ± 1.2 <sup>a,y</sup>	17.9 ± 1.1 <sup>a,y</sup>	8.16 ± 1.13 <sup>b,y</sup>	14.6 ± 0.7			
Mean		10.0 ± 0.8	11.5 ± 0.8	4.94 ± 0.80				
Fish	0	3.10 ± 1.17 <sup>a,x</sup>	4.60 ± 1.13 <sup>a,x</sup>	3.00 ± 1.15 <sup>a,x</sup>	3.57 ± 0.67	***	***	***
	6	57.6 ± 2.5 <sup>a,y</sup>	54.6 ± 2.4 <sup>a,y</sup>	9.53 ± 2.54 <sup>b,x</sup>	40.6 ± 1.4			
Mean		30.3 ± 1.4	29.6 ± 1.3	6.26 ± 1.39				
<b>Overall liking</b>	0	51.7 ± 2.7 <sup>a,x</sup>	52.9 ± 2.5 <sup>a,x</sup>	56.7 ± 2.6 <sup>a,x</sup>	53.8 ± 1.5	***	***	***
	6	23.3 ± 2.6 <sup>a,y</sup>	23.4 ± 2.5 <sup>a,y</sup>	58.0 ± 2.6 <sup>b,x</sup>	34.9 ± 1.5			
Mean		37.5 ± 2.3	38.1 ± 2.2	57.4 ± 2.3				

Sensory scale: 100-mm unstructured scale.

<sup>a,b,c</sup>Different superscript letters within the same row indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

<sup>x,y,z</sup>Different superscript letters within the same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

Data without superscripts indicate no significant differences ( $p > 0.05$ ).

<sup>(1)</sup> ns,  $p > 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

increased to find a deposition of polyphenols in muscle tissue, since it has been reported that the polyphenols showing firstly a protective effect in tissues with a higher fatty acid metabolic activity, such as liver in comparison to the muscle tissue (Gladine et al., 2007). However, the fattening period used in the present study is the usual period for lamb production in Spain and the authors also took into account that high levels of polyphenolic compounds in animal diets may have negative effects on dry matter intake and animal performance (Waghorn, 2008).

The chemical structure of the antioxidants used had an important relevance as the dietary supplementation of 300 ppm of VE (lipophilic compound) clearly resulted in a higher oxidative stability of the meat than the supplementation with 900 ppm of RWE (hydrophilic compound). In addition, within the same group of polyphenolic compounds, the form used as dietary supplementation could lead to differences in the results (Yilmaz, 2006). The different chemical structures of the compounds in the RWE could also present different bioavailability within the ruminant digestive system. In this sense, the use of dietary tea catechins did not exert antioxidant effect on beef meat stability during the storage (O'Grady et al., 2006a and 2006b; O'Grady, Maher, Troy, Moloney, & Kerry, 2006b). These authors concluded that the lack of an effect was due to a low antioxidant activity of the extract, as a consequence of the degradation of some of the tea catechins in the alkaline conditions of the bovine rumen and intestine. However, it has been reported that the proanthocyanidins show the maximum solubility and antioxidant capacity in basic solvent (Wood, Senthilmohan, & Peskin, 2002). In fact, Gladine, Rock, et al. (2007) reported that ruminants could

make polymeric proanthocyanidins bioavailable and benefit from their strong antioxidant capacity thanks to their biodegradation by rumen micro-organisms into monomeric compounds (epicatechin). The aforementioned trial was carried out using a grape extract rich in proanthocyanidins showing similar TPC and reducing capacity to the RWE (651 mg GAE/g of extract and 6630 µM of Trolox equivalents/g of extract, respectively). The main difference between studies was the supranutritional dose (10% DM ingested) used by Gladine, Morand, et al. (2007) and Gladine, Rock, et al. (2007).

One of the well-documented attributes of polyphenols is their ability to bind to proteins and facilitate precipitation. These protein-polyphenol interactions are believed to reduce the antioxidant capacity of polyphenols and such interactions can be both reversible/irreversible. However, the fate of these complexes in the gastrointestinal tract is not known (Arts et al., 2002).

Another factor to take into consideration is the fact that in the present study, the animals were fed an omega-3 enriched diet, thus, as suggested by Rivas-Cañedo et al. (2013), the available concentration of antioxidants within the muscle may have not been sufficient to delay oxidation when high PUFA levels are present.

#### 4. Conclusion

The inclusion of red wine extract in the lamb diet at the level of 900 mg/kg feed did not improve lipid or protein stability, or the sensory properties of lamb meat during the storage period. However, the *n*-6/*n*-

3 ratio in the meat resulted in a better value than without dietary antioxidant supplementation. The lack of an effect of red wine extract on oxidative stability of lamb meat could arise from the use of a low dose, potential low/no bioavailability of polyphenols, or due to a high level of *n*-3 fatty acids in the meat. Conversely, dietary vitamin E at the level of 300 mg/kg feed clearly improved the oxidative stability of *n*-3 enriched lamb meat throughout the storage period. Further research is necessary in order to determine the optimum level of inclusion of polyphenols in animal diets, as well as to understand the fate of the polyphenols within the digestive system of ruminants.

## Acknowledgements

This work was supported by RTA2009-00087-C02-01 (INIA) and P2009/AGR-1704 (Comunidad de Madrid) projects. The authors thank INIA for granting Iria Muñio with a predoctoral scholarship. The authors also thank Simon Fothergill for his valuable English support.

## References

- Álvarez, I., De la Fuente, J., Cañeque, V., Lauzurica, S., Pérez, C., & Díaz, M. T. (2009). Changes in the fatty acid composition of *M. longissimus dorsi* of lamb during storage in a high-oxygen modified atmosphere at different levels of dietary vitamin E supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 140–146.
- Álvarez, I., De la Fuente, J., Díaz, M. T., Lauzurica, S., Pérez, C., & Cañeque, V. (2008). Estimation of  $\alpha$ -tocopherol concentration necessary to optimise lamb meat quality stability during storage in high-oxygen modified atmosphere using broken-line regression analysis. *Animal*, *2*, 1405–1411.
- Arts, M. J. T. J., Haenen, G. M. M., Wilms, L. C., Beetstra, S. A. J. N., Heijnen, C. G. M., Voss, H. P., & Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and protein: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 1184–1187.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*, 70–76.
- Berker, K. I., Olgun, F. A. O., Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2013). Modified Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 4783–4791.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *28*, 25–30.
- Brogna, D. M. R., Tansawat, R., Cornforth, D., Ward, R., Bella, M., Luciano, G., Priolo, A., & Villalba, J. (2014). The quality of meat from sheep treated with tannin- and saponin-based remedies as a natural strategy for parasite control. *Meat Science*, *96*, 744–749.
- Campo, M. M., Nute, G. R., Hughes, S. I., Enser, M., Wood, J. D., & Richardson, R. I. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, *72*, 303–311.
- Cayuela, J. M., Garrido, M. D., Bañón, S. J., & Ros, J. M. (2003). Simultaneous HPLC analysis of  $\alpha$ -tocopherol and cholesterol in fresh pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 1120–1124.
- Díaz, M. T., Cañeque, V., Sánchez, C. I., Lauzurica, S., Pérez, C., Fernández, C., Álvarez, I., & De la Fuente, J. (2011). Nutritional and sensory aspects of light lamb meat enriched in *n*-3 fatty acids during refrigerated storage. *Food Chemistry*, *124*, 147–155.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat system: A review. *Meat Science*, *89*, 259–279.
- Estévez, M., & Heinonen, M. (2010). Effect of phenolic compounds on the formation of  $\alpha$ -aminoacidic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes from myofibrillar proteins oxidized by copper, iron, and myoglobin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 4448–4455.
- Ganhão, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010). Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, *85*, 402–409.
- Gasperi, F., Biasioli, F., Gallerani, G., Fasoli, S., & Piasentier, E. (2005). Training of a sensory panel for quantitative descriptive analysis of lamb meat. *Italian Journal of Food Science*, *17*, 255–268.
- Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Gruffat, D., Bauchart, D., & Durand, D. (2007). The antioxidant effect of plant extract rich in polyphenols differs between liver and muscle tissues in rats fed *n*-3 PUFA rich diets. *Animal Feed Science and Technology*, *139*, 257–272.
- Gladine, C., Rock, E., Morand, C., Bauchart, D., & Durand, D. (2007). Bioavailability and antioxidant capacity of plant extracts rich in polyphenols, given a single acute dose, in sheep made highly susceptible to lipoperoxidation. *British Journal of Nutrition*, *98*, 691–701.
- Huff-Loneragan, E., Zhang, W., & Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of post-mortem muscle – Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, *86*, 184–195.
- Jerónimo, E., Alfaia, C. M. M., Alves, S. P., Dentinho, M. T. P., Prates, J. A. M., Vasta, V., Santos-Silva, J., & Bessa, R. J. B. (2012). Effect of dietary grape seed extract and *Cistus ladanifer* L. in combination with vegetable oil supplementation on lamb meat quality. *Meat Science*, *92*, 841–847.
- Lauzurica, S., de la Fuente, J., Díaz, M. T., Álvarez, I., Pérez, C., & Cañeque, V. (2005). Effect of dietary supplementation of vitamin E on characteristics of lamb meat packed under modified atmosphere. *Meat Science*, *70*, 639–646.
- Lee, M. R. F., Tweed, J. K. S., Kim, E. J., & Scollan, N. D. (2012). Beef, chicken and lamb fatty acid analysis – A simplified direct bimethylation procedure using freeze-dried material. *Meat Science*, *92*, 863–866.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, *125*, 288–306.
- López-Andrés, P., Luciano, G., Vasta, V., Gibson, T., Biondi, A., Priolo, A., & Mueller-Harvey, I. (2013). Dietary quebracho tannins are not absorbed, but increase the antioxidant capacity of liver and plasma in sheep. *British Journal of Nutrition*, *110*, 632–639.
- Luciano, G., Monahan, F. J., Vasta, V., Biondi, L., Lanza, M., & Priolo, A. (2009). Dietary tannins improve lamb meat colour stability. *Meat Science*, *81*, 120–125.
- Luciano, G., Vasta, V., Monahan, F. J., López-Andrés, P., Biondi, L., Lanza, M., & Priolo, A. (2011). Antioxidant status, colour stability and myoglobin resistance to oxidation of *longissimus dorsi* muscle from lambs fed a tannin-containing diet. *Food Chemistry*, *124*, 1036–1042.
- Lund, M., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*, 83–95.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*, 727–747.
- Maraschiello, C., Sárraga, C., & García Regueiro, J. A. (1999). Glutathione peroxidase activity, TBARS, and  $\alpha$ -tocopherol in meat from chickens fed different diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 867–872.
- O'Grady, M. N., Maher, M., Troy, D. J., Monoley, A. P., & Kerry, J. P. (2006a). Dietary supplementation and addition of tea catechins: Assessment of the effects of catechins level and pH on antioxidant activity in fresh beef. *Proceedings 52nd International Congress of Meat Science and Technology* (pp. 735–736) August 13–18, (Dublin, Ireland).
- O'Grady, M. N., Maher, M., Troy, D. J., Moloney, A. P., & Kerry, J. P. (2006b). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science*, *73*, 132–143.
- O'Grady, M. N., Carpenter, R., Lynch, P. B., O'Brien, N. M., & Kerry, J. P. (2008). Addition of grape seed extract and bearberry to porcine diets: Influence on quality attributes of raw and cooked pork. *Meat Science*, *78*, 438–446.
- Qwele, K., Hugo, A., Oyedemi, S. O., Moyo, B., Masika, P. J., & Muchenje, V. (2013). Chemical composition, fatty acid content and antioxidant potential of meat from goats supplemented with Moringa (*Moringa oleifera*) leaves, sunflower cake and grass hay. *Meat Science*, *93*, 455–462.
- Rivas-Cañedo, A., Apeleo, E., Muñio, I., Pérez, C., Lauzurica, S., Pérez-Santaescobal, C., Díaz, M. T., Cañeque, V., & De la Fuente, J. (2013). Effect of dietary supplementation with either red wine extract or vitamin E on the volatile profile of lamb meat fed with omega-3 sources. *Meat Science*, *93*, 178–186.
- Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, *412*, 410–424.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144–158.
- Sukhija, P. S., & Palmquist, D. L. (1988). Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *36*, 1202–1206.
- Vasta, V., Mele, M., Serra, A., Scerra, M., Luciano, G., Lanza, M., & Priolo, A. (2009). Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate of herbage with or without tannins. *Journal of Animal Science*, *87*, 2674–2684.
- Waghorn, G. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for suitable sheep and goat production – Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, *147*, 116–137.
- Wood, J. E., Senthilmohan, S. T., & Peskin, A. V. (2002). Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry*, *77*, 155–161.
- Yilmaz, Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Food Science & Technology*, *17*, 64–71.

## ***Artículo 2***

### ***Use of red wine polyphenols as a natural preservative in health-promoting omega-3 fatty acid-enriched lamb patties***

Iria Muíño, Jesús de la Fuente, Concepción Pérez, Elizabeth Apeleo, Cristina Pérez-Santaescolástica, Vicente Cañeque, Sara Lauzurica, Rubén Bermejo, María Teresa Díaz

#### **Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of a red wine extract (RWE) rich in polyphenols (50, 100 and 200 mg gallic acid equivalents/kg meat) as a natural antioxidant in lamb meat patties enriched with n-3 PUFA (100 mg n-3 PUFA/100 g meat) stored for up to 9 days, and to compare its effect with that of using  $\alpha$ -tocopherol (TOC) (100 mg/kg meat). Addition of RWE delayed metmyoglobin formation ( $p \leq 0.001$ ), lipid oxidation ( $p \leq 0.001$ ) and loss of n-3 PUFA ( $p \leq 0.0$ ) relative to controls, while TOC had a minor effect on preventing meat discolouration and loss of thiol groups ( $p \leq 0.001$ ). Lamb odour was lower ( $p \leq 0.01$ ) and odd odour higher ( $p \leq 0.001$ ) in patties with the highest dose of RWE added compared to controls, but the overall liking score was not compromised.

**Keywords-** polyphenols,  $\alpha$ -tocopherol, omega-3 fatty acids, meat shelf-life

## 1. Introduction

The pattern of consumption of meat and meat products is undergoing a change in developed and high-income countries, leading to a decrease in meat intake (Vranken, Avermaete, Petalios, & Mathijs, 2014). Apart from consumer environmental and animal welfare awareness, one of the main causes of this shift in meat consumption behaviour is related to health concerns (Vranken et al., 2014). Red meat consumption has been linked to the development of chronic diseases, such as obesity, cardiovascular disease and some cancers, mainly attributed to its saturated fat content – despite the fact that this relationship is not fully justified (Klurfeld, 2015). As a consequence of this consumer perception and demand for healthier products, new meat-based functional foods have been introduced to the meat industry by including bioactive compounds in their formulations such as omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) (Olmedilla-Alonso, Jiménez-Colmenero, & Sánchez-Muniz, 2013). The potential benefits and effects of n-3 PUFA, mainly the long-chain n-3 PUFA (LC n-3 PUFA), on human health are widely known, including a protective action against cardiovascular diseases, inflammatory diseases and mental disorders. They are also an important component of the brain and central nervous system (Shahidi, 2015). However, increasing the n-3 PUFA content presents a major challenge to the meat industry since these fatty acids are highly susceptible to lipid oxidation, which eventually compromises both the nutritional and the organoleptic quality of the meat product (Bernardi, Bertol, Pflanzner, Sgarbieri, & Pollonio, 2016). Hence, the use of antioxidants and/or an appropriate packaging in these novel meat products seems to be essential.

Food processors have used synthetic antioxidants such as butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) for several decades. However, consumer worries relating to safety and toxicity of those compounds led to a rejection of synthetic in favour of natural additives (Devcich, Pedersen, & Petrie, 2007). Research on the use of naturally-occurring antioxidant compounds such as tocopherols and plant polyphenols on oxidative stability of meat and meat products has yielded promising results, suggesting a positive effect of these compounds in delaying oxidative processes in meat (Bernardi et al., 2016). The use of natural sources of protective agents is an interesting strategy for two main reasons. On the one hand, use of natural antioxidants would address the rejection of synthetic compounds by consumers (Devcich et al.,

2007). On the other hand, natural antioxidants perform antioxidant activity in the product itself and also in the body of the consumer (Shahidi & Zhong, 2010), hence achieving two functions: as preservatives and as bioactive or health-promoting compounds.

The antioxidant activity of polyphenolic compounds depends mainly on their chemical structure and degree of hydroxylation and includes scavenging actions on free radicals, chain-breaking activity and/or metal chelation properties (Shahidi & Naczki, 2004). Research on the use of plant polyphenols as natural antioxidants in meat and meat products has significantly increased over the last decade and encompasses a great variety of plant sources, i.e. vegetables, fruits, herbs and spices. One of these sources comes from the wine industry, including grape seed and/or peel extracts, but also grape pomace and by-products from wine making, which have been successfully demonstrated in poultry, pork and beef, improving lipid stability in the meat (Bernardi et al., 2016).

$\alpha$ -Tocopherol is widely recognised as a chain-breaking antioxidant. The positive effect of  $\alpha$ -tocopherol used in the animal diet (supplemented as dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate) in delaying oxidative processes in the subsequent meat is well known (e.g. Muñio et al., 2014). Nevertheless, the use of  $\alpha$ -tocopherol directly added to the meat and meat product as a preservative showed conflicting results, with some effect on slowing oxidation in some cases (Botsoglou, Govaris, Ambrosiadis, Fletouris, & Papageorgiou, 2014), but not in others (Lee, Decker, Faustman, & Mancini, 2005).

The purpose of the present study was to evaluate the effectiveness of red wine polyphenols, as natural antioxidants, in health-promoting omega-3-enriched lamb meat; and to compare its effect with that of using  $\alpha$ -tocopherol. The study was performed using minced lamb meat (highly susceptible to oxidation) stored in high O<sub>2</sub> modified atmosphere packs (HiOx-MAP) (70% O<sub>2</sub>/30% CO<sub>2</sub>) for up to 9 days at 4 °C. HiOx-MAP are commonly used for short-term chilled storage of meat to prevent meat discolouration and microbial spoilage.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and meat supplements

Ferrous sulphate ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); trolox (6-hydroxy-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-carboxylic acid); fluorescein; 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH); malondialdehyde (MA); 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH); 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and fatty acid methyl ester (FAME) mixture were supplied by Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). Deodorised fish oil was supplied by AFANSA, S.A. (Vigo, Spain). Red wine extract (RWE), rich in polyphenols, was obtained from Provinols<sup>TM</sup>, Seppic, S.A. (Paris, France). According to the manufacturer's details, the RWE obtained from selected red wine produced in France presents a dark red to purple colour, a tannic odour and an astringent taste, and consists of 7.4% flavanols (catechin, epicatechin, epicatechin 3-*O*-gallate, and proanthocyanidins B1-B4, and prodelpinidin B2 3-*O*-gallate), 0.8% phenolic acids (chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, and gallic acid) and 0.17% stilbenes (resveratrol). Total phenol content (550 mg gallic acid equivalents (GAE)/g extract), FRAP (58,231 mM  $\text{Fe}^{2+}$  equivalents/g extract) and DPPH (10,724  $\mu\text{M}$  trolox equivalents/g extract) radical scavenging activities of RWE were previously reported by Muíño et al. (2014). DL- $\alpha$ -tocopherol (TOC) was purchased from Panreac (Barcelona, Spain) in form of a yellow viscous oil.

### 2.2. Preparation, packaging and storage of lamb meat patties

Lamb legs were purchased from a local supermarket (Mercamadrid S.A., Madrid, Spain) and transported under refrigeration (2 °C) to the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology pilot plant (Madrid, Spain). After removing visual subcutaneous fat and connective tissue, the quadriceps femoris muscles were cut into small cubes and minced twice, once through a 5 mm plate (PM-70 model, Equipamientos Cárnicos, S.L. -Mainca-, Granollers, Spain) and minced again through a 3 mm plate. Deodorized fish oil was added to the minced meat to produce approximately 100 mg LC n-3 PUFA/100 g of meat. Five batches of ground lamb meat were manufactured: 100 mL of cold water was added to the control group batch (CON patties); increasing concentrations of red wine extract (RWE) diluted in cold water (final volume 100 mL) were added to three other batches (RWE patties) to obtain the

final total phenol contents of 50 mg GAE/kg meat (RWE50 patties), 100 mg GAE/kg meat (RWE100 patties) and 200 mg GAE/kg meat (RWE200 patties); and 100 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg meat in cold water (final volume 100 mL) were added to the last batch (TOC patties).

Minced lamb meat was thoroughly mixed in a food mixer (RM-20 model, Equipamientos Cárnicos, S.L. -Mainca-, Granollers, Spain) and lamb patties of 100 g (n = 3 per batch and storage time), with 10 cm diameter and 1 cm thick, were formed in a burger-maker. Some of the lamb patties were directly vacuum-packed in metallic polyester pouches (PET/MET+PE, Sacoliva S.L.<sup>®</sup>, Barcelona, Spain) of low O<sub>2</sub> permeability (<1.5 cc/m<sup>2</sup>/24h) and low water vapour transmission rate (<1.5 mg/m<sup>2</sup>/24h) and frozen at -20 °C remaining as 0-day samples. The remainder of the lamb patties were packed in HiOx-MAP (70% O<sub>2</sub>/30% CO<sub>2</sub>) (EAP 20, Carbueros Metálicos S.A., Barcelona, Spain) using a packing machine (EV-15-1-CD-SC, Tecnotrip S.A., Barcelona, Spain) and stored in the dark at 4 °C for 3, 6 or 9 days. The HiOx-MAP (PA/PE, Sacoliva S.L.<sup>®</sup>, Barcelona, Spain) pouches were composed of 150  $\mu$ m polyamide/polyethylene (50/100), with low gas permeability (18 cc/m<sup>2</sup>/24h O<sub>2</sub> at 23 °C, 55 cc/m<sup>2</sup>/24h CO<sub>2</sub> and 4.0 cc/m<sup>2</sup>/24h at 23 °C) and low water vapour transmission rate (1.8 g/m<sup>2</sup>/24h at 23 °C and 85% relative humidity). After each storage time, lamb patties were vacuum-packaged and frozen as explained above, until required for analysis. Frozen lamb patties from each treatment were freeze-dried in a Cryodos 50 freeze-dryer (Telstar S.A., Madrid, Spain) for analysis of antioxidant capacity (at day 0) and fatty acid content (on days 0, 3, 6 and 9)

#### 2.3. *In vitro* antioxidant activity of lamb meat patties

##### 2.3.1. Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

The FRAP assay was performed in triplicate. Freeze-dried lamb patties (0.5 g) were homogenised for 2 min at 3000 rpm using a DI 25 basic homogeniser (IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) in 10 mL of 75 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). Following centrifugation (Universal 32R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) at 5000 rpm for 15 min, supernatants were filtered (FILTER-LAB<sup>®</sup> 1242, Filtros Anovia S.A., Barcelona, Spain) and collected. The FRAP activity of samples was

performed following the method described by Benzie and Strain (1996) and calculated using a ferrous sulphate ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) standard curve (100-1000  $\mu\text{M}$ ). Results were expressed as  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  equivalents/g meat.

#### 2.3.2. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

The ORAC assay was performed in duplicate following the procedure proposed by Wu, Duckett, Neel, Fontenot, and Clapham (2008) for hydrophilic ORAC assay. The fluorimeter (Jenway 6270 Staffordshire, UK) was programmed to record the fluorescence reading with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm at 1 min intervals for 30 min. The area under the curve was calculated using Microsoft Excel<sup>®</sup> software and ORAC activity was calculated using a trolox standard curve (6.25, 12.5, 25 and 50  $\mu\text{M}$ ). Results were expressed as  $\mu\text{mol trolox equivalents (TE)/g meat}$ .

#### 2.4. Instrumental colour measurements on lamb meat patties

Instrumental colour parameters were measured in the CIE  $L^*a^*b^*$  colour space (measured area diameter of 8 mm, excluding a specular component, standard illuminant  $D_{65}$ , observer angle  $10^\circ$  and calibration using a white tile - CM-A145) using a Minolta CM-2006d spectrophotometer (Minolta Camera Co., Osaka, Japan). Three measurements were taken on three non-overlapping zones of the sample at each storage time (0, 3, 6 and 9 days) and mean values were calculated. The colour coordinates were expressed as  $L^*$  (lightness),  $a^*$  (redness) and  $b^*$  (yellowness). Hue angle was calculated as  $\tan^{-1}(b^*/a^*)$  and total colour change ( $\Delta E$ ) over the storage period (between days 0 and 9) was calculated as  $\Delta E_{0.9} = [(L^*_9 - L^*_0)^2 + (a^*_9 - a^*_0)^2 + (b^*_9 - b^*_0)^2]^{1/2}$  (AMSA, 2012). The relative proportion of metmyoglobin (MetMb) was calculated according to Krzywicki (1979), by measuring the achromatic absorption of lamb meat at 690 nm (De la Fuente, Álvarez, Díaz, Pérez, & Cañeque, 2005).

#### 2.5. Measurement of lipid oxidation by TBARS in lamb meat patties

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) values were determined in duplicate at each storage time (days 0, 3, 6 and 9), following the method proposed by

Maraschiello, Sarraga, and García-Regueiro (1999). Results were expressed as mg malonaldehyde equivalents (MAE)/kg meat.

#### *2.6. Evaluation of protein oxidation in lamb meat patties*

##### *2.6.1. Protein carbonyl groups content by the DNPH method*

According to the method of derivatisation with DNPH described by Ganhão, Morcuende, and Estévez (2010), the formation rate of carbonyl groups was measured in triplicate over the storage period (on days 0, 3, 6 and 9). Results were expressed as nmol carbonyl groups/mg protein.

##### *2.6.2. Protein thiol groups content by Ellman's reagent*

The loss of thiol groups in lamb meat patties was measured by derivatisation with Ellman's reagent (DTNB) following the procedure described by Jongberg, Skov, Tørngren, Skibsted, and Lund (2011). Measurements were performed in triplicate over the storage period (0, 3, 6 and 9 days). The thiol content was calculated using a molar extinction coefficient of  $11,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Results were expressed as nmol thiol groups/mg protein.

#### *2.8. Fatty acid analysis of lamb meat patties*

Fatty acid methyl esters (FAMES) of freeze-dried lamb meat patties were formed in duplicate according to the method proposed by Lee, Tweed, Kim, and Scollan (2012), in samples from 0, 3, 6 and 9 days. Tridecanoic acid (13:0) was added as an internal standard. The final organic layers with the FAMES were transferred to a 2 mL vial, capped and stored at  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis.

FAMES were analysed by gas chromatography with flame ionisation detection (Perkin-Elmer Autosystem-1:A, Massachusetts, USA). The technical characteristics of the chromatography method employed for fatty acid characterization were previously described (Muñío et al., 2014). Individual FAMES were identified by comparing their retention times with those from a standard FAME mixture. Results were expressed as mg FAMES/100 mg meat.

#### 2.7. Sensory analysis of cooked lamb meat patties

Sensory evaluation was performed in lamb patties for days 0 and 3 of storage period. The sensory panel was composed of eight members and trained as previously described by Muñio et al. (2014). Briefly, panellists were trained in the sensory profiling of lamb meat and in the specific lamb, fat and oxidised odour and flavour. Additionally, the sensory panel was trained to assess fish odour and flavour. The sensory descriptors assessed by the panellists were odour (lamb, rancid, fish, odd), flavour (lamb, fatty, rancid, fish, odd), texture (juiciness, chewiness), and overall liking.

Lamb patties were thawed overnight at 4 °C, wrapped in aluminium foil and cooked in a pre-heated domestic oven (XF0303-TG, Unox, Vigodarzere, Italy) at 175 °C, until an internal temperature of 70 °C was reached. The temperature was measured by a thermocouple probe (K-type thermocouple) inserted into the centre of each patty. After cooking, samples were cut into portions of 2 cm<sup>2</sup> and wrapped in aluminium foil. Each sample was labelled with a single random three-digit code and placed in a heated incubator until sensory analysis. Panellists assessed ten samples per session: two storage periods (0 and 3 days) for each of the five treatments, using an unstructured 100-mm line scale, anchored at each end. Panel members evaluated the samples under red light conditions and received unsalted bread and water at room temperature to cleanse their palate between samples.

#### 2.8. Statistical analysis

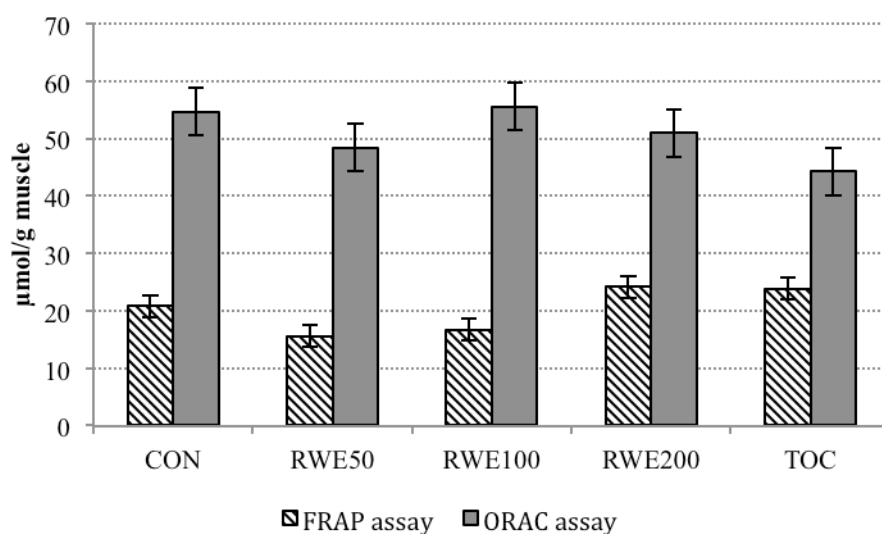
Data were analysed using the 9.1.2 Statistical Analysis System package (SAS Institute, Cary, USA.). One-way analysis of variance was performed for antioxidant capacity (FRAP and ORAC) and total colour change ( $\Delta E$ ) data using GLM procedure; treatment was used as the main factor. Instrumental colour parameters, TBARS values, protein carbonyl and thiol groups, fatty acid composition and sensory scores were analysed by two-way analysis of variance using GLM procedure with treatment and storage period as main factors, and interaction between both factors included in the model. For sensory analysis, the effect of the panellist and the session were included in the model. When significant differences were observed between main factors and when the interaction

between both factors (treatment x storage period) was significant, a Dunn-Šidak test was performed for mean comparisons ( $p \leq 0.05$ ).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. *In vitro* radical scavenging activity in lamb meat patties

*In vitro* radical scavenging activity in lamb patties at the beginning of storage period (day 0) was determined by FRAP and ORAC assays and is shown in Figure 1. There were no differences between treatments regarding radical scavenging capacity measured by the FRAP or ORAC assays.



**Figure 1.** *In vitro* antioxidant capacity, measured by FRAP assay ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  eq/g muscle) and ORAC assay ( $\mu\text{mol Trolox}$  eq/g muscle), of n-3 enriched lamb meat patties containing different levels of antioxidants. CON: control without antioxidant; RWE50: 50 mg GAE/kg muscle; RWE100: 100 mg GAE/kg muscle; RWE200: 200 mg GAE/kg muscle; TOC: 100 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg muscle. RWE: red wine extract. The error bars represent the standard error.

Nevertheless, it is worth noting that assays based on the capacity of antioxidants for scavenging free radicals and on the capacity of antioxidants for inhibiting protein/lipid oxidation in a sample do not always agree since they measure different properties of the systems, with the latter involving more actions than only radical quenching capacity. According to Alamed, Chaiyasit, McClements, and Decker (2009), the antioxidant capacity of a compound in foods does not only depend on its radical scavenging ability, but is also related to its ability to use different antioxidant mechanisms, to participate in redox reactions, to interact with prooxidants or other antioxidants, and is related to its

physical location in the food. In fact, the effectiveness of a grape seed extract for preventing lipid oxidation in minced fish muscle did not show a clear relationship with its *in vitro* antioxidant capacity, measured by reducing power, chelating capacity and radical scavenging capacity (Maestre, Micol, Funes, & Medina, 2010).

#### 3.2. Instrumental colour parameters and MetMb percentage in lamb meat patties

Data on the instrumental colour parameters in lamb patties throughout the storage period (0, 3, 6 and 9 days) for the different treatments are presented in Table 1. An interaction between treatment and storage period was found for lightness values ( $L^*$ ;  $p \leq 0.05$ ), redness values ( $a^*$ ;  $p \leq 0.001$ ), hue angle values ( $p \leq 0.001$ ) and metmyoglobin percentage (MetMb;  $p \leq 0.001$ ). Lower  $L^*$  values were found in RWE50 and RWE200 patties compared to TOC patties, and CON and RWE100 patties had intermediate values on day 3 of the storage period. At 6 days of storage, RWE200 patties presented a lower  $L^*$  value compared to CON and TOC patties. According to MacDougall (1982), an increase of  $L^*$  values could be related to an increase in light scattering caused by changes in the structure of muscle proteins as a consequence of oxidative processes, rather than a result of changes in the myoglobin redox state (Resconi, Escudero, Beltrán, Olleta, Sañudo, & Campo, 2012). Therefore, lower  $L^*$  value in RWE200 patties could be associated with less intense oxidation. Differences were found with respect to  $a^*$  values at the beginning of the storage period (day 0), where RWE100, RWE200 and TOC patties showed lower  $a^*$  values compared to CON patties. This fact may be related to the intrinsic colour of the additives used since changes in the product's natural colour due to the addition of different extracts have been previously observed. For instance, the addition of grape seed flour to beef frankfurters resulted in a decrease in  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values (Özvural & Vural, 2011) and cooked chicken meatballs with added grape extract showed less  $L^*$  and  $b^*$  values than controls (Shirahigue, Contreras-Castillo, Selani, Nadai, Mourão, & Gallo, 2011). RWE200 and RWE100 patties showed more consistent  $a^*$  values during the entire storage period than RWE50, TOC and CON patties, in which  $a^*$  values decreased in a more pronounced manner. Regarding hue angle, lower values were found in RWE100 and RWE200 patties compared to CON and TOC patties at days 6 and 9 of storage period. Hue angle is understood as the real colour of a sample, since it describes the colour as “we

communicate it in language, i.e. red, yellow, green, blue, etc.” (AMSA, 2012) and it was proposed as a good indicator of discolouration in meat. Increasing values of hue angle indicate discolouration of meat as a consequence of a reduction of  $a^*$  value and an increase of MetMb percentage (AMSA, 2012) on the meat surface, that is, ranging from red to brown as a result of myoglobin oxidation (Mancini & Hunt, 2005). Therefore, RWE100 and RWE200 patties showed more stable colour since changes in hue angles took place in a less noticeable manner over the storage period; furthermore, hue angle did not change in RWE200 throughout the storage.

Regarding the MetMb percentage, RWE and TOC patties showed lower rates of MetMb formation than CON patties at 6 days of storage period and RWE patties had lower percentage of MetMb compared to CON and TOC patties at the end of storage period (day 9). Hence, an oxidation of red oxymyoglobin to brownish metmyoglobin took place in a less pronounced manner in RWE patties. It has been reported that meat with MetMb values greater than 40% was downgraded by trained judges and consumer panels (Greene, Hsin, & Zipsper, 1971), as brown colour is associated with a loss of meat freshness and wholesomeness (Mancini & Hunt, 2005). Taking into account this acceptability limit, CON patties would be rejected at 6 days and consumers would reject TOC patties at 9 days of storage period while RWE patties might be still acceptable.

Results pointed out the potential of RWE to prevent meat discolouration, supported by the results obtained from the total colour change ( $\Delta E$ ) over the storage period, which was lower in RWE200 patties compared to CON patties (Figure 2). TOC patties also presented lower  $\Delta E$  value than CON patties despite the fact that TOC patties did not present as clear an antioxidant effect as RWE patties in individual colour parameters studied ( $L^*$  and hue angle).

In line with the present results, beef patties containing white grape extract (500 mg/kg meat) stored in HiOx-MAP (Jongberg, Skov, Tørngren, Skibsted, & Lund, 2011) maintained a redder colour at the end of storage period (9 days) compared to controls samples. Similarly, ground beef enriched with n-3 PUFA containing grape seed extract (250 mg/kg) and stored in aerobic conditions for up to 6 days, resulted in higher  $a^*$  values compared to controls (Gómez, Beriain, Mendizabal, Realini, & Purroy, 2016). However, in the latter study, the addition of grape seed extract was not able to slow

### 3. Resultados y discusión

down MetMb formation when minced meat was enriched with n-3 PUFA, reaching a value of 85% of MetMb at 6 days of retail display.

**Table 1.** Instrumental colour parameters measured in n-3 enriched lamb meat patties over 9-day storage period (SP) in HiOx-MAP, containing different levels of antioxidants. CON: control without antioxidant; RWE<sup>(1)</sup>50: 50 mg GAE<sup>(2)</sup>/kg muscle; RWE100: 100 mg GAE/kg muscle; RWE200: 200 mg GAE/kg muscle; TOC: 100 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg muscle.

	SP Days	Treatment (T)					Mean	SEM	Significance <sup>(3)</sup>		
		CON	RWE50	RWE100	RWE200	TOC			T	SP	TxSP
<i>L</i> *	0	45.3	45.8	45.4	43.6	45.4	45.1	2.14	***	ns	*
	3	45.4 <sup>wx</sup>	41.8 <sup>x</sup>	44.1 <sup>wx</sup>	41.9 <sup>x</sup>	48.3 <sup>w</sup>	44.3				
	6	48.3 <sup>w</sup>	45.5 <sup>w</sup>	43.2 <sup>wx</sup>	39.0 <sup>x</sup>	46.6 <sup>w</sup>	44.5				
	9	47.1	47.1	43.2	42.1	46.3	45.2				
	Mean	46.5	45.1	44.0	41.7	46.6					
<i>a</i> *	0	16.6 <sup>a,w</sup>	14.1 <sup>a,wx</sup>	13.3 <sup>a,xy</sup>	12.5 <sup>a,xy</sup>	10.9 <sup>a,y</sup>	13.5	1.02	***	***	***
	3	11.6 <sup>b</sup>	10.6 <sup>b</sup>	10.4 <sup>b</sup>	10.2 <sup>ab</sup>	9.53 <sup>ab</sup>	10.5				
	6	6.64 <sup>c,x</sup>	8.88 <sup>bc,wx</sup>	9.78 <sup>b,w</sup>	9.17 <sup>ab,w</sup>	7.32 <sup>bc,wx</sup>	8.36				
	9	6.33 <sup>c</sup>	6.90 <sup>c</sup>	7.65 <sup>b</sup>	7.82 <sup>b</sup>	5.35 <sup>c</sup>	6.81				
	Mean	10.3	10.1	10.3	9.91	8.26					
Hue angle	0	52.5 <sup>b</sup>	54.9 <sup>b</sup>	55.9 <sup>b</sup>	57.1 <sup>a</sup>	58.4 <sup>b</sup>	55.8	2.38	***	***	***
	3	56.6 <sup>b</sup>	60.1 <sup>ab</sup>	57.5 <sup>ab</sup>	56.8 <sup>a</sup>	60.4 <sup>ab</sup>	58.3				
	6	67.1 <sup>a,w</sup>	62.9 <sup>a,wx</sup>	57.0 <sup>ab,x</sup>	59.4 <sup>a,x</sup>	66.9 <sup>a,w</sup>	62.6				
	9	71.0 <sup>a,w</sup>	66.1 <sup>a,wx</sup>	63.0 <sup>a,x</sup>	60.9 <sup>a,x</sup>	71.4 <sup>a,w</sup>	66.5				
	Mean	61.8	61.0	58.3	58.5	64.3					
MetMb (%)	0	16.5 <sup>d</sup>	16.8 <sup>b</sup>	18.0 <sup>c</sup>	19.4 <sup>c</sup>	15.6 <sup>d</sup>	17.3	2.31	***	***	***
	3	26.7 <sup>c,x</sup>	34.1 <sup>a,w</sup>	26.2 <sup>b,x</sup>	25.9 <sup>b,x</sup>	26.7 <sup>c,x</sup>	27.9				
	6	42.5 <sup>b,w</sup>	30.5 <sup>a,x</sup>	31.1 <sup>ab,x</sup>	30.6 <sup>ab,x</sup>	34.4 <sup>b,x</sup>	33.8				
	9	49.4 <sup>a,x</sup>	36.5 <sup>ab,y</sup>	34.8 <sup>a,y</sup>	34.5 <sup>a,y</sup>	59.1 <sup>a,w</sup>	42.9				
	Mean	33.8	29.5	27.5	27.6	34.0					

<sup>(1)</sup> RWE: red wine extract

<sup>(2)</sup> GAE: gallic acid equivalents

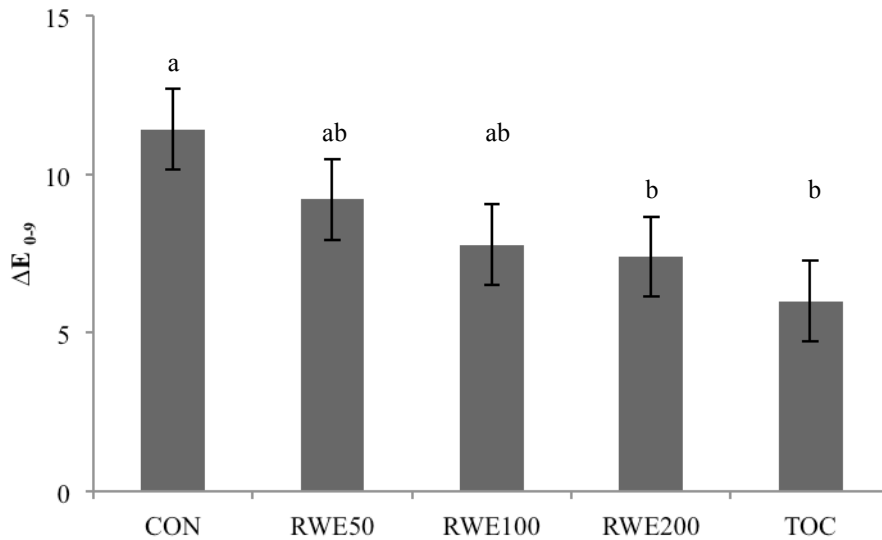
<sup>(3)</sup> ns,  $p > 0.05$ ; \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

<sup>a,b,c,d</sup> Different superscript letters within the same column indicate significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>w,x,y</sup> Different superscript letters within the same row indicate significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

Regarding the effect of  $\alpha$ -tocopherol in preventing meat discolouration, other authors reported no significant differences of adding  $\alpha$ -tocopherol to minced beef stored in HiOx-MAP on Hunter 'a' values during a 10-day storage period (O'Grady, Monahan, Burke, & Allen, 2000). Lee et al. (2005) found greater *a*\*

values and lower hue angle values when adding rosemary extract to n-3 oil fortified beef patties than when using a mixture of tocopherol isomers, similar to the results obtained in this study.



**Figure 2.** Total colour change ( $\Delta E_{0-9}$ ) between days 0 and 9 of storage in HiOx-MAP, measured in n-3 enriched lamb meat patties containing different levels of antioxidants: CON, control without antioxidant; RWE50, 50 mg GAE/kg muscle; RWE100, 100 mg GAE/kg muscle; RWE200, 200 mg GAE/kg muscle; TOC, 100 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg muscle. RWE: red wine extract. Different letters (a-b) indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between treatments. The error bars represent the standard error

### 3.3. Lipid and protein oxidation in lamb meat patties

An interaction between treatment and storage period ( $p \leq 0.001$ ) was found for lipid oxidation (TBARS values) (Table 2). From day 3 onwards, TBARS values in CON and TOC patties increased greatly in comparison to RWE patties, exceeding the proposed acceptability limit of 2 mg of MAE/kg of muscle, used as a marker for the development of rancid off-flavours in meat (Campo, Nute, Hughes, Enser, Wood & Richardson, 2006). Addition of RWE to lamb patties delayed lipid oxidation at all time points in comparison to CON patties, with RWE200 patties not exceeding the threshold value for rancidity perception during the first 6 days of storage.

Results obtained by the use of RWE are in agreement with those reported using 250 mg grape seed extract/kg meat in minced beef enriched with omega-3 fatty acids throughout dietary strategies (addition of 10% linseed to the diet) and stored in aerobic packs at 2

°C for 6 days in an illuminated retail display cabinet, where a delay in lipid oxidation processes, measured by TBARS, was observed (Gómez et al., 2016). In line with our results, Lee et al. (2005) did not find significant differences relative to controls in TBARS values when adding 0.03% mixed tocopherol isomers (based on fat content) to ground beef enriched with LC n-3 PUFA (500 mg fish oil/110 g meat) stored in aerobic packs for 6 days at 4 °C. Other authors have found a slight effect on reducing lipid oxidation when a mixture of tocopherols was used in meat products, however, this effect was clearly weaker compared to the use of plant extracts such as rosemary extracts (Azizkhani & Tooryan, 2015). The undisputed great efficiency of  $\alpha$ -tocopherol as a chain-breaking antioxidant is attributed to its specific location within the cellular membrane in close proximity to the phospholipids fatty acids, which also account for membrane integrity (Niki & Traber, 2012). The fact that, in the present study,  $\alpha$ -tocopherol was added directly to meat and was not located in its natural position, together with the disruption of the muscle membrane by mincing that releases heme and non-heme iron (which acts as catalyst for lipid oxidation), could lead to the inability of  $\alpha$ -tocopherol to associate with muscle phospholipids and protect them against oxidation (O'Grady et al., 2000), thus failing in preventing TBARS formation. Moreover, the content of LC n-3 PUFA (highly susceptible to oxidation) present in the meat and/or a high proportion of oxygen (HiOx-MAP), could make the dose used insufficient to slow down lipid oxidation.

In relation to protein oxidation, there were no differences between treatments on protein carbonyl content (Table 2), which increased ( $p \leq 0.001$ ) during the storage period in all types of patties. Similarly, Jongberg, Skov, Tørngren, Skibsted, and Lund (2011) did not find differences in protein carbonyl content between beef patties with white grape extract (500 ppm of extract in the meat) and controls during a 9-day storage period in HiOx-MAP at 4 °C. By contrast, cooked pork lamb patties enriched with n-3 fatty acids and with 50 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg meat, exhibited lower concentrations of carbonyls than patties without antioxidants added during 9 days in refrigerated storage (Botsoglou et al., 2014).

**Table 2.** Lipid (TBARS) and protein oxidation measured in n-3 enriched lamb meat patties over 9-day storage period (SP) in HiOx-MAP, containing different levels of antioxidants. CON: control without antioxidant; RWE<sup>(1)</sup>50: 50 mg GAE<sup>(2)</sup>/kg muscle; RWE100: 100 mg GAE/kg muscle; RWE200: 200 mg GAE/kg muscle; TOC: 100 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg muscle.

	SP Days	Treatment (T)					SEM	Mean	Significance <sup>(3)</sup>		
		CON	RWE50	RWE100	RWE200	TOC			T	SP	TxSP
TBARS (mg MAE/kg muscle)	0	0.41 <sup>d</sup>	0.47 <sup>c</sup>	0.24 <sup>c</sup>	0.35 <sup>c</sup>	0.28 <sup>d</sup>	0.35	0.40	***	***	***
	3	3.04 <sup>c,w</sup>	0.83 <sup>c,x</sup>	0.45 <sup>c,x</sup>	0.58 <sup>c,x</sup>	3.04 <sup>c,w</sup>	1.90				
	6	5.57 <sup>b,w</sup>	3.74 <sup>b,x</sup>	3.56 <sup>b,x</sup>	1.81 <sup>b,y</sup>	5.07 <sup>b,w</sup>	3.95				
	9	6.66 <sup>a,x</sup>	4.99 <sup>a,y</sup>	4.69 <sup>a,y</sup>	3.59 <sup>a,z</sup>	8.05 <sup>a,w</sup>	5.60				
	Mean		3.92	2.51	2.24	1.58	4.11				
Protein carbonyl (nmol/mg protein)	0	1.75	2.50	2.65	2.32	2.23	2.29 <sup>c</sup>	0.65	ns	***	ns
	3	2.85	3.22	3.14	2.63	3.23	3.04 <sup>b</sup>				
	6	3.98	3.52	3.45	2.69	3.81	3.49 <sup>b</sup>				
	9	5.11	4.78	3.64	3.95	4.01	4.30 <sup>a</sup>				
	Mean		3.42	3.50	3.22	2.92	3.32				
Thiol groups (nmol/mg protein)	0	27.0	28.1	26.3	26.5	30.8	27.8 <sup>a</sup>	2.41	***	***	ns
	3	20.5	17.9	21.1	19.4	24.8	20.7 <sup>b</sup>				
	6	17.6	16.3	20.8	15.5	19.6	17.9 <sup>c</sup>				
	9	14.3	16.2	14.6	15.6	19.8	16.1 <sup>d</sup>				
	Mean		19.2 <sup>x</sup>	19.6 <sup>x</sup>	20.7 <sup>x</sup>	19.3 <sup>x</sup>	23.8 <sup>w</sup>				

<sup>(1)</sup>RWE: red wine extract

<sup>(2)</sup>GAE: gallic acid equivalents

<sup>(3)</sup>ns,  $p > 0.05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

<sup>a,b,c,d</sup>Different superscript letters within the same column indicate significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>w,x,y,z</sup>Different superscript letters within the same row indicate significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

Thiol group content (Table 2) decreased during the storage period ( $p \leq 0.001$ ) in all lamb patties and TOC patties presented the highest content compared to the others ( $p \leq 0.001$ ), without any differences between CON patties and RWE patties. It has been observed in a meat model system (Jongberg, Gislason, Lund, Skibsted, & Waterhouse, 2011) and later in fresh beef stored in HiOx-MAP (Jongberg, Lund, Waterhouse, & Skibsted, 2011) that phenolic compounds having a catechol group (ortho-phenolic structures, e.g. catechin, epicatechin and proanthocyanidins in RWE) might interact with thiol groups leading a thiol-oxidized phenol adduct. Those authors suggested that the formation of the adduct might block protein thiols so as they cannot react with DTNB reagent and, moreover, they cannot be susceptible to oxidation. It might explain why RWE did not show any effect on thiol groups compared to controls. However, it is

worth highlighting that we cannot confirm this fact since no other analysis (e.g. SDS-PAGE gel electrophoresis) on protein oxidation were performed in the present study. In this sense, Jongberg, Skov, Tørngren, Skibsted, and Lund (2011) reported a lower content of thiol groups in beef patties with white grape extract (500 ppm of extract in the meat) compared to control groups, but also less disulphide bond formation (which would indicate less loss of thiol groups). These authors explained this inconsistency as a result of interactions between thiol groups and the polyphenols present in the white grape extract. Regarding the antioxidant effect observed in TOC patties, Botsoglou et al. (2014) also observed a positive effect of using 50 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg meat in retarding loss of thiol groups in cooked pork patties enriched with n-3 fatty acids and stored at 4 °C.

#### 3.4. Long-chain n-3 PUFA content in lamb meat patties

A mean value for LC n-3 PUFA content of 91.6 mg EPA+DHA/100 g meat was obtained, hence largely achieving the desired target level proposed of 100 mg LC n-3 PUFA/100g meat, with no differences between treatments (Table 3). According to the Commission Regulation (EU) n°116/2010, all of the lamb patties would be considered as “high in omega-3 fatty acids” product during the first half of the storage period (day 3), since they contained more than 80 mg EPA+DHA/100 g product. There was an interaction between treatment and storage period ( $p \leq 0.01$ ).

The content of LC n-3 PUFA decreased in all types of patties over the storage period, nevertheless, this decrease took place in a less noticeable manner in RWE200 patties, which showed a higher content than CON patties at 9 days. In fact, RWE100 and RWE200 patties would be still labelled as a “source of omega-3 fatty acids”, due to the presence of more than 40 mg EPA+DHA/100 g product at the end of storage (day 9). These results could be related to those described above regarding TBARS values where RWE200 patties showed the highest effectiveness in retarding lipid oxidation (Table 2). Similarly, no antioxidant activity was observed in TOC patties for preventing loss of LC n-3 PUFA, a finding that can be explained in a similar way to that of the TBARS values: both  $\alpha$ -tocopherol and LC n-3 PUFA were added directly to meat so that they were not in the natural place.

**Table 3.** Long chain n-3 PUFA (EPA+DHA<sup>(1)</sup>) measured in n-3 enriched lamb meat patties over 9-day storage period (SP) in HiOx-MAP, containing different levels of antioxidants. CON: control without antioxidant; RWE<sup>(2)</sup>50: 50 mg GAE<sup>(3)</sup>/kg muscle; RWE100: 100 mg GAE/kg muscle; RWE200: 200 mg GAE/kg muscle; TOC: 100 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg muscle.

	SP Days	Treatment (T)					SEM	Significance <sup>(4)</sup>			
		CON	RWE50	RWE100	RWE200	TOC		Mean	T	SP	TxSP
EPA+DHA (mg/100 g meat)	0	95.2 <sup>a</sup>	99.8 <sup>a</sup>	89.7 <sup>a</sup>	95.7 <sup>a</sup>	77.8 <sup>a</sup>	91.6	15.7			
	3	91.8 <sup>a</sup>	95.6 <sup>a</sup>	110.0 <sup>a</sup>	80.5 <sup>ab</sup>	82.7 <sup>a</sup>	92.1		ns	***	**
	6	72.6 <sup>a</sup>	76.4 <sup>a</sup>	57.3 <sup>b</sup>	69.6 <sup>ab</sup>	63.3 <sup>a</sup>	67.8				
	9	21.5 <sup>b,w</sup>	39.6 <sup>b,wx</sup>	43.6 <sup>b,wx</sup>	62.5 <sup>b,x</sup>	31.0 <sup>b,wx</sup>	39.6				
<i>Mean</i>		70.3	77.9	75.1	77.1	63.7					

<sup>(1)</sup> EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid

<sup>(2)</sup> RWE: red wine extract

<sup>(3)</sup> GAE: gallic acid equivalents

<sup>(4)</sup> ns,  $p > 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

<sup>a,b</sup> Different superscript letters within the same column indicate significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>w,x</sup> Different superscript letters within the same row indicate significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

Similarly to our results, Lee, Faustman, Djordjevic, Faraji, and Decker (2006) achieved more than 87% of the target level of LC n-3 PUFA proposed (500 mg DHA/110 g meat) by incorporating an n-3 oil-in-water emulsion from algal oil (40-42% DHA) in fresh ground turkey patties and fresh pork sausages. These authors did not find differences in DHA concentration in either type of meat product during storage at 4 °C for up to 6 days in the dark, neither with nor without an added antioxidant combination (sodium erythorbate, sodium citrate and rosemary). Nevertheless, it is noteworthy that the n-3 emulsion used in the latter study contained mixed tocopherols that could stabilise the emulsion during the storage.

### 3.5. Sensory evaluation of cooked lamb meat patties

Sensory scores of cooked lamb patties on day 0 and 3 of the storage period are presented in Table 4. In general, sensory attributes were affected by storage period and minor differences were found among treatments. There were no significant interactions between treatment and storage period for any of the attributes studied.

Lamb and odd odour decreased during the storage and both were affected by treatment. The highest scores for odd odour were found in RWE200 patties followed by RWE100 patties as a result of the tannic odour of the extract itself. This fact might also have covered up the lamb odour in the same group of patties, which obtained the lowest values for this attribute. Rancid odour increased over the storage period, probably due to the increase of lipid oxidation, which resulted in development of off-odours (Bernardi et al., 2016). No differences were found among treatments despite the fact that at 3 days of storage clear differences were observed regarding TBARS values (Table 2). It is worth noting that panellists scored very low values for rancid odour in all the lamb patties, taking into account that we used a 100-point scale and this might be the reason for no differences found in this attribute. Similarly to our results, the addition of 300 mg/kg of a grape seed extract to beef patties did not have any effect on rancid odour development (Bañón, Díaz, Rodríguez, Garrido, & Price, 2007). Fish odour increased in all types of patties during the storage period in a more noticeable manner than rancid odour. In the current study, LC n-3 PUFA were added to meat directly as fish oil and they did not incorporate into cell membranes. Consequently, the oxidative reactions occurring over the storage period led to the development of fish odour rather than rancid odour, which was also observed in PUFA-fortified foods with added fish oils (Ganesan, Brothersen, & McMahon, 2014).

There were no differences in fatty and rancid flavours, either during storage period or between treatments. Bañón et al. (2007) reported a positive effect of a grape seed extract (300 mg/kg) for reducing the development of rancid flavour. However, it has to be mentioned that the values obtained for rancid flavour in the present study were quite low, as with rancid odour. Lamb and odd flavour decreased and fish flavour increased over the storage period. As abovementioned, the development of fish flavour instead of rancid flavour (the most common flavour for lipid oxidation) (Campo et al., 2006) took place as a consequence of adding fish oil directly to the meat (Ganesan et al., 2014).

The texture of lamb patties was affected by the storage period, with juiciness decreasing and chewiness increasing on day 3 of storage. Both attributes of meat texture can be affected by protein oxidation (Lund, Heinonen, Baron, & Estévez, 2011) and might be related to the increase in protein carbonyl groups and to the loss of thiol groups explained earlier, which took place at 3 days of the storage period in the five treatments

(Table 2). Unexpectedly, juiciness was affected by treatment, with RWE200 patties scoring higher on juiciness than RWE50 patties and CON, RWE100 and TOC patties had an intermediate value. In contrast to our results, other investigators reported that the addition of 500 ppm of white grape extract to beef patties stored in HiOx-MAP did not show any effect on juiciness (Jongberg, Skov, Tørngren, Skibsted, & Lund, 2011).

The overall liking of cooked lamb patties decreased at 3 days of storage and was not affected by any of the treatments studied. Hence, the differences found regarding lamb and odd odour did not influence the general acceptability of the lamb patties, making the use of RWE a possible strategy for the meat industry.

#### *3.5. RWE patties enriched with LC n-3 PUFA as a potential meat-based functional food*

The European market for functional foods is still smaller than in other parts of the world, such as Japan and US, mainly due to regulation patterns and consumer opinion regarding these types of products (Siró, Kápolna, Kápolna, & Lugasi, 2008). Nevertheless, research regarding future trends in meat consumption in Spain revealed that, although the consumption of functional foods is still lower, experts believe that there will be an increase in demand for modified lipid profile meat products in the coming years (Chamorro, Miranda, Rubio, & Valero, 2012). In fact, consumer preference for beef meat enriched with omega-3 fatty acids has been reported when this property was mentioned to consumers and when it did not compromise sensory attributes (Baba, Kallas, Costa-Font, Gil, & Realini, 2016).

Recommendations for the suggested daily intake levels of EPA and DHA vary globally depending on the regional health advisory organisations and authorities (Global Organisation for EPA and DHA – GOED, 2014). According to the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) (2010), an amount of 250 mg/day of EPA plus DHA has been proposed as an adequate intake for healthy adult population. Taking this data into consideration, patties during the first 3 days of storage in the present study would cover about 37% of the daily-recommended intake and RWE200 patties would still provide 25% of this intake after 9 days of storage period (Table 3). Moreover, RWE increased the shelf life of lamb patties from an oxidative point of view,

keeping RWE200 lamb patties below the acceptability limit for rancidity resulting from lipid oxidation (< 2 mg MAE/kg muscle; Campo et al., 2006) until 6 days of storage (Table 2) and preventing meat discolouration in all RWE patties in terms of MetMb percentage (< 40%; Greene et al., 1971) during the entire storage period (9 days) (Table 1).

Nonetheless, polyphenols present in RWE may have an activity beyond their antioxidant function as a food preservative, since their consumption has been related to biological health actions such as anticarcinogenic, anti-inflammatory, antiatherogenic and cardioprotective effects (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). The main antioxidant effect of red wine polyphenols seems to take place at the gastrointestinal level, preventing oxidation of lipids and other important dietary constituents such as vitamin E and, consequently, reducing the levels of lipid peroxides in plasma after a red meat meal (Kanner, Gorelik, Roman & Kohen, 2012), which in turn give high importance to a PUFA-enriched meal.

In the present study  $\alpha$ -tocopherol only exerted a slight effect on colour (Figure 2) and on thiol group stability of lamb patties (Table 2). However, it would be interesting to evaluate the possibility of testing a combination of RWE and  $\alpha$ -tocopherol in future studies for several reasons. On the one hand, when  $\alpha$ -tocopherol acts as antioxidant by donating its phenolic hydrogen, a tocopheroxyl radical is formed (Niki & Traber, 2012). Red wine polyphenols could reduce this radical to regenerate  $\alpha$ -tocopherol, thereby exerting a synergetic effect (Iglesias, Pazos, Torres, & Medina, 2012). On the other hand, with this recycling of  $\alpha$ -tocopherol, it may be possible to use different doses of RWE in order to reduce the odd odour detected by the sensory panel, which would be the main drawback in the present study for achieving a marketable health-promoting meat product.

**Table 4.** Sensory evaluation<sup>(1)</sup> of cooked *n*-3 enriched lamb meat patties over 3-day storage period (SP) in HiOx-MAP, containing different levels of antioxidants. CON: control without antioxidant; RWE<sup>(2)</sup>50: 50 mg GAE<sup>(3)</sup>/kg muscle; RWE100: 100 mg GAE/kg muscle; RWE200: 200 mg GAE/kg muscle; TOC: 100 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg muscle.

	SP Days	Treatment (T)					Mean	SEM	Significance <sup>(4)</sup>		
		CON	RWE50	RWE100	RWE200	TOC			T	SP	TxSP
<b>Odour</b>											
Lamb	0	35.1	33.0	24.7	18.8	34.4	29.2	15.5	**	***	ns
	3	23.1	21.9	19.6	16.9	20.9	20.5				
Mean		29.1 <sup>w</sup>	27.4 <sup>w</sup>	22.1 <sup>wx</sup>	17.8 <sup>x</sup>	27.7 <sup>w</sup>					
Rancid	0	0.39	0.51	1.05	0.64	0.52	0.62	3.28	ns	*	ns
	3	1.68	0.65	0.77	2.92	2.37	1.68				
Mean		1.04	0.58	0.91	1.78	1.44					
Fish	0	1.00	0.00	4.19	2.28	4.58	2.39	17.0	ns	***	ns
	3	28.7	25.3	11.3	18.5	23.8	21.5				
Mean		14.9	12.6	7.74	10.4	14.2					
Odd	0	8.07	11.3	20.5	28.9	13.4	16.4	15.1	***	*	ns
	3	12.9	7.94	15.7	20.6	7.50	12.9				
Mean		10.5 <sup>x</sup>	9.61 <sup>x</sup>	18.1 <sup>wx</sup>	24.8 <sup>w</sup>	10.4 <sup>x</sup>					
<b>Flavour</b>											
Lamb	0	37.0	33.0	31.2	25.2	36.8	32.6	14.9	ns	***	ns
	3	18.1	18.6	22.8	21.1	24.2	21.0				
Mean		27.5	25.8	27.0	23.2	30.5					
Fatty	0	4.16	3.85	2.13	1.38	0.00	2.30	5.68	ns	ns	ns
	3	3.80	1.59	0.32	4.26	4.13	2.82				
Mean		3.98	2.72	1.22	2.82	2.05					
Rancid	0	0.00	3.22	2.00	0.23	0.00	0.98	6.79	ns	ns	ns
	3	2.09	1.46	0.00	5.74	2.82	2.28				
Mean		0.81	2.34	0.64	2.99	1.36					
Fish	0	2.24	0.00	5.35	0.43	5.58	2.57	18.5	ns	***	ns
	3	31.0	31.3	18.5	26.1	29.6	27.3				
Mean		16.6	15.3	11.9	13.3	17.6					
Odd	0	16.4	31.5	23.3	32.2	21.9	25.1	15.7	ns	***	ns
	3	17.5	16.0	14.3	16.2	8.98	14.6				
Mean		17.0	23.7	18.8	24.2	15.4					

<sup>(1)</sup>Sensory scale: 100-mm unstructured scale.

<sup>(2)</sup>RWE: red wine extract

<sup>(3)</sup>GAE: gallic acid equivalents

<sup>(4)</sup>ns,  $p > 0.05$ ; \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

<sup>w,x</sup>Different superscript letters within the same row indicate significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

### 3. Resultados y discusión

**Table 4.** (Continuación)

	SP Days	Treatment (T)					Mean	SEM	Significance <sup>(4)</sup>		
		CON	RWE50	RWE100	RWE200	TOC			T	SP	TxSP
<b>Texture</b>											
Juiciness	0	47.5	41.3	49.6	59.7	47.1	49.0	17.5	*	***	ns
	3	34.8	36.8	38.9	41.2	34.5	37.2				
Mean		41.2 <sup>wx</sup>	39.1 <sup>x</sup>	44.2 <sup>wx</sup>	50.4 <sup>w</sup>	40.8 <sup>wx</sup>					
Chewiness	0	26.1	24.6	21.7	15.6	20.7	21.8	15.7	ns	**	ns
	3	30.4	22.8	28.1	26.4	27.4	27.0				
Mean		28.3	23.7	24.9	21.0	24.1					
<b>Overall liking</b>	0	51.0	47.6	55.0	48.1	49.2	50.2	18.2	ns	***	ns
	3	30.3	28.2	29.5	32.1	30.8	30.2				
Mean		40.7	37.9	42.3	40.1	40.0					

<sup>(1)</sup>Sensory scale: 100-mm unstructured scale.

<sup>(2)</sup>RWE: red wine extract

<sup>(3)</sup>GAE: gallic acid equivalents

<sup>(4)</sup>ns,  $p > 0.05$ ; \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

<sup>w,x</sup>Different superscript letters within the same row indicate significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

## 5. Conclusion

Addition of a red wine extract (RWE) to lamb meat patties enriched in omega-3 fatty acids delayed colour deterioration in terms of metmyoglobin formation after a 9-day storage period and the use of the highest dose of RWE (200 mg gallic acid equivalent/kg meat) kept lamb meat patties within the consumer acceptability limit for lipid oxidation for 6 days of storage. By contrast,  $\alpha$ -tocopherol was poorly effective at promoting the oxidative stability of lamb meat patties. The overall acceptability of lamb meat patties was not affected by the addition of RWE, despite the fact that panellists reported an odd odour related to the extract. The designed RWE lamb meat patties would be labelled as “high in omega-3 fatty acids” and they would be still sold as “source of omega-3 fatty acids” at the end of the storage period, covering from 16% to 25% of the daily-recommended intake for long-chain omega-3 fatty acids. Furthermore, consumers might benefit from the potential antioxidant effect of RWE in the organism after consumption.

## 6. References

- Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D.J., & Decker, E.A. (2009). Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2969-2976.
- AMSA (2012). *Meat color measurement guidelines*. American Meat Science Association and National Livestock and Meat Board ([www.meatscience.org](http://www.meatscience.org)).
- Azizkhani, M. & Tooryan, F. (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extract, mint extract and a mixture of tocopherols in beef sausage during storage at 4°C. *Journal of Food Safety*, 35, 128-136.
- Baba, Y., Kallas, Z., Costa-Font, M., Gil, J.M., & Realini, C.E. (2016). Impact of hedonic evaluation on consumers' preferences for beef attributes including its enrichment with n-3 and CLA fatty acids. *Meat Science*, 111, 9-17.
- Bañón, S., Díaz, P., Rodríguez, M., Garrido, M.D., & Price, A. (2007). Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat Science*, 77, 626-633.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Bernardi, D.M., Bertol, T.M., Pflanzler, S.B., Sgarbieri, C., & Pollonio, M.A.R. (2016).  $\omega$ -3 in meat products: benefits and effects on lipid oxidative stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 2620-2634.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, I., Fletouris, D., & Papageorgiou, G. (2014). Effect of olive leaf (*Olea europea* L.) extracts on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties enriched with n-3 fatty acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 227-234.
- Campo, M.M. Nute, G.R., Hughes, S.I., Enser, M., Wood, J.D., & Richardson, R.I. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, 72, 303-311.
- Chamorro, A., Miranda, F., Rubio, S., & Valero, V. (2012). Innovations and trends in meat consumption: An application of the Delphi method in Spain. *Meat Science*, 92, 816-822.

Commission Regulation of European Union. (2010). Commission Regulation (EU) No 116/2010, amending Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council with regard to the list of nutrition claims. *Official Journal of the European Union*, L 37, 10/02/10, 16-18.

De la Fuente, J., Álvarez, I., Díaz, M.T., Pérez, C., & Cañeque, V. (2005). Determinación de los pigmentos de la carne por espectrofotometría. In: Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del product (animal vivo, canal, carne y grasa) en los ruminates. Cañeque, V. y Sañudo, C. INIA pp. 226-236.

Devcich, D.A., Pedersen, I.K., & Petrie, K.J. (2007). You eat what you are: Modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite*, 48, 333-337.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) (2010). Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8(3):1461, 1-107. Available at: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1461>

Ganesan, B., Brothersen, C., & McMahon, D.J. (2014). Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 98-114.

Ganhão, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010). Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, 85, 402-409.

Global Organisation for EPA and DHA (GOED) (2014). Global recommendations for EPA and DHA intake (Rev. 19 November 2014). Available at: [http://www.issfal.org/GlobalRecommendationsSummary19Nov2014Landscape\\_-3-.pdf](http://www.issfal.org/GlobalRecommendationsSummary19Nov2014Landscape_-3-.pdf)

Gómez, I., Beriain, M.J., Mendizabal, J.A., Realini, C., & Purroy, A. (2016). Shelf life of ground beef enriched with omega-3 and/or conjugated linoleic acid and use of grape seed extract to inhibit lipid oxidation. *Food Science & Nutrition*, 4, 67-79.

Greene, B.E., Hsin, I., & Zipser, M.W. (1971). Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. *Journal of Food Science*, 36, 940-942.

- Iglesias, J., Pazos, M., Torres, J.L., & Medina, I. (2012). Antioxidant mechanism of grape procyanidins in muscle tissues: Redox interactions with endogenous ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol. *Food Chemistry*, *134*, 1767-1774.
- Jongberg, S., Gislason, N.E., Lund, M.N., Skibsted, L.H., & Waterhouse, A.L. (2011). Thiol-quinone adduct formation in myofibrillar proteins detected by LC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 6900-6905.
- Jongberg, S., Lund, M.N., Waterhouse, A.L., & Skibsted, L.H. (2011). 4-Methylcatechol inhibits protein oxidation in meat but not disulfide formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 10329-10335.
- Jongberg, S., Skov, S.H., Tørngren, M.A., Skibsted, L.H., & Lund, M.N. (2011). Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. *Food Chemistry*, *128*, 276-283.
- Kanner, J., Gorelik, S., Roman, S., & Kohen, R. (2012). Protection by polyphenols of postprandial human plasma and low-density lipoprotein modification: The stomach as a bioreactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *2012*, 8790-8796.
- Klurfeld, D.M. (2015). Research gaps in evaluating the relationship of meat and health. *Meat Science*, *109*, 86-95.
- Krzywicki, K. (1979). Assessment of relative content of myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin at the surface of beef. *Meat Science*, *3*, 1-10.
- Lee, M.R.F., Tweed, J.K.S., Kim, E.J., & Scollan, N.D. (2012). Beef, chicken and lamb fatty acid analysis – a simplified direct bimethylation procedure using freeze-dried material. *Meat Science*, *92*, 863-866.
- Lee, S., Decker, E.A., Faustman, C., & Mancini, R.A. (2005). The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in n-3 oil fortified ground beef patties. *Meat Science*, *70*, 683-689.
- Lee, S., Faustman, C., Djordjevic, D., Faraji, H., & Decker, E.A. (2006). Effect of antioxidants on stabilization of meat products fortified with n-3 fatty acids. *Meat Science*, *72*, 18-24.

- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., & Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, 83-95.
- MacDougall, D.B. (1982). Changes in the colour and opacity of meat. *Food Chemistry*, 9, 75-88.
- Maestre, R., Micol, V., Funes, L., & Medina, I. (2010). Incorporation and interaction of grape seed extract in membranes and relation with efficacy in muscle foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8365-8374.
- Mancini, R.A. & Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71, 100-121.
- Maraschiello, C., Sárraga, C., & García Regueiro, J.A. (1999). Glutathione peroxidase activity, TBARS, and  $\alpha$ -tocopherol in meat from chickens fed different diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 867-872.
- Muñoz, I., Apeleo, E., de la Fuente, J., Pérez-Santaescolástica, C., Rivas-Cañedo, A., Pérez, C., Díaz, M.T., Cañequé, V., & Lauzurica, S. (2014). Effect of dietary supplementation with red wine extract or vitamin E, in combination with linseed and fish oil, on lamb meat quality. *Meat Science*, 98, 116-123.
- Niki, E. & Traber, M.G. (2012). A history of vitamin E. *annals of Nutrition & Metabolism*, 61, 207-212.
- O'Grady, M.N., Monahan, F.J., Burke, R.M., & Allen, P. (2000). The effect of oxygen level and exogenous  $\alpha$ -tocopherol on the oxidative stability of minced beef in modified atmosphere packs. *Meat Science*, 55, 39-45.
- Olmedilla-Alonso, B., Jiménez-Colmenero, F., & Sánchez-Muniz, F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science*, 95, 919-930.
- Özvural, E.B. & Vural, H. (2011). Grape seed flour is a viable ingredient to improve the nutritional profile and reduce lipid oxidation of frankfurters. *Meat Science*, 88, 179-183.
- Resconi, V.C., Escudero, A., Beltrán, J.A., Olleta, J.L., Sañudo, C., & Campo, M.M. (2012). Color, lipid oxidation, sensory quality, and aroma compounds of beef steaks

displayed under different levels of oxygen in a modified atmosphere package. *Journal of Food Science*, 71, S10-S18.

Shahidi, F. (2015). Omega-3 fatty acids and marine oils in cardiovascular and general health: A critical overview of controversies and realities. *Journal of Functional Foods*, 19, 797-800.

Shahidi, F. & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effect – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.

Shahidi, F. & Naczki M. (2004). Antioxidant properties of food phenolics. In *Phenolics in Food and Nutraceuticals* (pp. 397-438). Boca Raton, FL: CRC Press.

Shahidi, F. & Zhong Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 930-940.

Shirahigue, L.D., Contreras-Castillo, C.J., Selani, M.M., Nadai, A.P., Mourão, G.B., & Gallo, C.R. (2011). Winery grape-residue extract: effects on quality and sensory attributes of cooked chicken meat. *Food Science and Biotechnology*, 20, 1257-1264.

Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. *Appetite*, 51, 456-467.

Vranken, L., Avermaete, T., Petalios, D., & Mathijs, E. (2014). Curbing global meat consumption: Emerging evidence of a second nutrition transition. *Environmental Science & Policy*, 39, 95-106.

Wu, C., Duckett, S.K., Neel, J.P.S., Fontenot, J.P., & Clapham, W.M. (2008). Influence of finishing systems on hydrophilic and lipophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC) in beef. *Meat Science*, 80, 662-667.

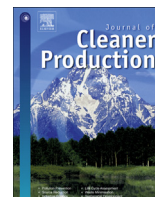
***Artículo 3***

***Valorisation of an extract from olive oil waste as a natural antioxidant for reducing meat waste resulting from oxidative processes***

Muñoz, I., Díaz, M.T., Apeleo, E., Pérez-Santaescolástica, C., Rivas-Cañedo, A., Pérez, C., Lauzurica, S., Cañeque, V., De la Fuente, J.

Journal of Cleaner Production, 140 (2017), 924-932





## Valorisation of an extract from olive oil waste as a natural antioxidant for reducing meat waste resulting from oxidative processes



Iria Muño <sup>a,\*</sup>, María Teresa Díaz <sup>a</sup>, Elizabeth Apeleo <sup>b</sup>, Cristina Pérez-Santaescolástica <sup>b</sup>, Ana Rivas-Cañedo <sup>a</sup>, Concepción Pérez <sup>c</sup>, Vicente Cañeque <sup>a</sup>, Sara Lauzurica <sup>b</sup>, Jesús de la Fuente <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña, km. 7, Madrid, 28040, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro, s/n, Madrid, 28040, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Biología (Fisiología Animal), Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro, s/n, Madrid, 28040, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 November 2015

Received in revised form

3 June 2016

Accepted 27 June 2016

Available online 29 June 2016

#### Keywords:

Agriculture waste

Valorization

Polyphenols

Food waste

Meat shelf-life

### ABSTRACT

Spain is the biggest olive oil producer in the world what means that this area is especially affected by olive mill waste pollution. The main system used for extracting olive oil is the continuous two-phase centrifugation system, which generates olive wet cake waste. This wastage has disposal problems due to its phytotoxicity and high moisture content, so strategies for its use and revalorization are needed. One of these strategies is the extraction of bioactive compounds, as is the case of polyphenols present in the waste, which could be used as natural antioxidants in food.

This study evaluated the effect of adding an olive waste extract (100, 200 or 400 mg gallic acid equivalents/kg muscle), as a possible natural polyphenol-rich antioxidant on the stability of lamb meat patties enriched with omega-3 fatty acids, and stored in high-oxygen modified atmosphere packs for up to 9 days at 4 °C. Addition of the extract delayed meat discolouration, lipid oxidation ( $p \leq 0.001$ ) and protein carbonylation ( $p \leq 0.001$ ), and increased loss of thiol groups ( $p \leq 0.05$ ) relative to controls. Fish odour ( $p \leq 0.01$ ) and flavour ( $p \leq 0.05$ ) were lower and odd odour and flavour ( $p \leq 0.001$ ) higher in patties with added the extract compared to controls, but the overall liking score was not affected. The addition of the extract resulted in acceptable lamb meat patties (in terms of oxidation) after 6 days of storage, while patties without extract did not.

The results pointed out the potential for using olive waste extracts as natural antioxidants in meat products. With this strategy, the olive oil industry would encourage to follow an eco-friendlier olive oil production chain obtaining marketable products from the wastes generated. At the same time, the shelf-life (in terms of oxidation process) of the lamb patties would be increased reducing food wastes at the point-of-sale and at consumer level, which is especially important in a high perishable food such as minced meat products, and reducing the environmental impact that food waste causes along the food supply chain.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Olive oil production in the European Union (EU), according to the International Olive Oil Council (IOOC), was around 75.8% of the world's production from 2009 to 2015, with Spain the largest

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [muino.iria@gmail.com](mailto:muino.iria@gmail.com) (I. Muño), [diaz.teresa@inia.es](mailto:diaz.teresa@inia.es) (M.T. Díaz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.175>

0959-6526/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

producer (followed by Italy and Greece) responsible for an average of 62.7% of the total production in the EU over those years. Provisional data put olive oil production in Spain at 841,200 tonnes during 2014 and 2015 (IOOC, 2016). As an agricultural activity, olive oil industry causes diverse adverse effects on the environment, and several Life Cycle Assessment analyses carried out in olive oil-producing Mediterranean countries (Avraamides and Fatta, 2008; Salomone and Ioppolo, 2012; Tsarouhas et al., 2015), have pointed out the generation, management and treatment of olive oil wastes

as one of the main hot spots to take into consideration when trying to reach an environment-friendlier olive oil production chain. The amount and physico-chemical characteristics of the wastes generated vary mainly according to the process used for the extraction of olive oil. The traditional discontinuous press extraction process and the continuous three-phase centrifugation process generate a solid residue (olive cake) and a liquid residue (olive mill wastewaters), while the two-phase centrifugation process generates a very wet solid residue (olive wet cake) (Vlyssides et al., 2004; Roig et al., 2006). Olive cake is usually further processed for soil conditioning and composting (Vlyssides et al., 2004), or to produce biomass fuel because of its high calorific power (Roig et al., 2006). However, the olive mill wastewaters and olive wet cake are especially detrimental to the environment due to its high organic and phenolic content, which are the main responsible for phytotoxicity. Moreover, the high moisture content of the olive wet cake makes it more difficult to handle. Different approaches have been development in order to reduce these olive oil wastes (reviewed by Roig et al., 2006). Most of them aimed at detoxification of such waste in order to return it to the olive tree cultivation area, and hence achieving an end-of-pipe management of the wastes. One interesting approach is the recovery of high valuable bioactive compounds present in the olive oil wastes, such as polyphenols, which deal with the increasing interest on valorising wastes by recovery biomolecules (Baiano, 2014). The main polyphenols reported to be present in olive oil wastes have been classified as tyrosol related compounds and derivatives of benzoic and cinnamic acids (Torrecilla, 2010). These phenolic compounds have great antioxidant properties and may be of interest from a biological and pharmaceutical standpoint for use in cosmetics and medicine as well as for using as ingredients in nutraceutical products and as food antioxidants (Mirabella et al., 2014). This strategy would valorise olive oil wastes, leaving a remarkable by-product rather than just a waste, and at the same time minimising environmental impact.

The use of olive oil waste extracts as food antioxidants in meat may be of interest for several reasons. On one hand, high oxygen modified atmosphere packs (HiOx-MAP) have been widely used by the meat industry in order to preserve the bright red colour in meat (O'Sullivan and Kerry, 2010). However, the drawback of using HiOx-MAP is that it increases oxidative processes in meat, while the colour might still be desirable, leading to a loss of nutritional and sensory value: lipid oxidation triggers the production of toxic compounds and leads to off-flavours (Kanner, 1994), and protein oxidation harms essential amino acids, affecting texture attributes of meat and reducing protein digestibility (Lund et al., 2011).

On the other hand, growing consumer demand for healthier nutrition is leading the meat industry to develop meat-based functional foods by including bioactive compounds in their formulations that provide health benefits beyond the nutritional properties of the meat product itself. One of these strategies is modification of the fatty acid profile by adding plant or marine lipids as functional ingredients, increasing the content of unsaturated fat (Olmedilla-Alonso et al., 2013). Nevertheless, the increase of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in meat could make it more prone to lipid oxidation with the consequent deterioration in product quality.

Therefore, under this pro-oxidative scenario (HiOx-MAP and high PUFA content), the use of antioxidants is a prerequisite for the meat industry in order to reduce food wastage due to a short shelf-life of the product. It is especially relevant considering that one-third of the world food production is wasted along the supply chain and that the 40% is wasted at the retail and consumer level (Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, 2011). Spain ranked seventh in food waste generation within the

European Union countries (7.7 million tonnes), which means that 175.9 kg/year per capita are wasted (Spanish Ministry of Agriculture, Food and the Environment, 2013). Research on the use of plant based natural antioxidants on oxidative stability of meat and meat products has greatly increased over the last decade, and several studies have indicated a positive effect of these compounds in delaying oxidative processes in meat (e.g. Shah et al., 2014).

Hence, the aim of this study was to evaluate the effectiveness of an olive waste extract on the oxidative stability and sensory properties of lamb meat patties enriched with omega-3 (n-3) fatty acids during refrigerated storage in HiOx-MAP for up to 9 days.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and meat supplements

Ferrous sulphate ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), fluorescein, 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), malondialdehyde (MA), 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) were supplied by Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, USA).

Deodorised fish oil was supplied by AFANSA, S.A. (Vigo, Spain). Olive waste extract (OE) (Hytolive<sup>®</sup>) was obtained from GENOSA I + D, S.A. (Malaga, Spain). According to the manufacturer's details, the OE was extracted from olive wet cake and consisted of 10.5% hydroxytyrosol (HXTYR) and 1.6% tyrosol (TYR) (Fig. 1). The rest of the product consisted mainly in the carrier (maltodextrins, 40–60%), and other plant material (rest up to 100%) was also present. The total phenol content (Singleton and Rossi, 1965) was estimated at 348.2 mg gallic acid equivalents/g OE. The antioxidant activity was 1115.9 mg  $\text{Fe}^{2+}$  equivalents/g OE determined by ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay (Benzie and Strain, 1996) and 68.24 mmol trolox equivalents/g OE by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay (Brand-Williams et al., 1995).

### 2.2. Preparation, packaging and storage of lamb meat patties

Lamb legs from Spanish light lamb were purchased from a local supermarket (Mercamadrid S.A., Madrid, Spain) and transported at refrigerated temperatures to the INIA pilot plant (National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, Madrid, Spain). After removing visual subcutaneous fat and connective tissue, the quadriceps femoris muscles were cut into small cubes and minced twice, once through a 5 mm plate (PM-70 model, Equipamientos Cárnicos, S.L. (Mainca), Granollers, Spain) and minced again through a 3 mm plate. Minced lamb meat was formulated with the appropriate volume of deodorized fish oil to produce 100 mg long-chain fatty acids/100 g of muscle. Subsequently, four batches of lamb meat were manufactured: 100 mL of cold water without olive waste extract was added to the control group batch (CON patties), and increasing concentrations of olive waste extract diluted in cold

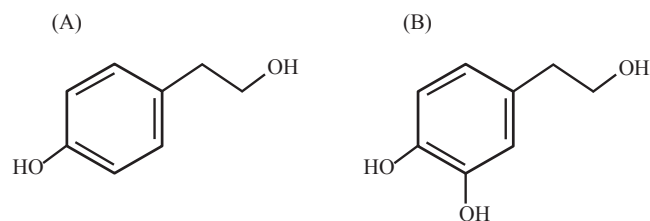


Fig. 1. Chemical structure of (A) tyrosol and (B) hydroxytyrosol.

water (final volume 100 mL) were added to three other batches (OE patties) to obtain the final total phenol contents of 100 mg GAE/kg meat (OE100 patties), 200 mg GAE/kg meat (OE200 patties) and 400 mg GAE/kg meat (OE400 patties). Immediately after adding the ingredients, the minced lamb meat was thoroughly mixed in a food mixer (RM-20 model, Equipamientos Cárnicos, S.L. (Mainca), Granollers, Spain) and formed into 100 g patties ( $n = 3$  per batch and storage time) using a conventional burger-maker. The average dimensions of the patties were 10 cm in diameter and 1 cm thick. A number of lamb patties were collected and directly vacuum-packed in metallic polyester pouches (PET/MET + PE, Sacoliva S.L.<sup>®</sup>, Barcelona, Spain) of low O<sub>2</sub> permeability (<1.5 cc/m<sup>2</sup>/24 h) and low water vapour transmission rate (<1.5 mg/m<sup>2</sup>/24 h), then frozen at -20 °C until needed for analysis as 0-day samples. Three frozen lamb patties from each treatment at 0 days were diced into 1 cm<sup>3</sup> portions and freeze-dried in a Cryodos 50 freeze-dryer (Telstar S.A., Madrid, Spain) for analysis of antioxidant capacity.

The rest of the lamb patties were randomly assigned to one of three storage periods (3, 6 or 9 days), packed in HiOx-MAP (70% O<sub>2</sub>/30% CO<sub>2</sub>) (EAP 20, Carburros Metálicos S.A., Barcelona, Spain) using a packing machine (EV-15-1-CD-SC, Tecnotrip S.A., Barcelona, Spain) and stored in the dark at 4 °C. The pouches used for storage in MAP (PA/PE, Sacoliva S.L.<sup>®</sup>, Barcelona, Spain) were composed of 150 µm polyamide/polyethylene (50/100), with low gas permeability (18 cc/m<sup>2</sup>/24 h O<sub>2</sub> at 23 °C, 55 cc/m<sup>2</sup>/24 h CO<sub>2</sub> and 4.0 cc/m<sup>2</sup>/24 h at 23 °C) and low water vapour transmission rate (1.8 g/m<sup>2</sup>/24 h at 23 °C and 85% relative humidity). After the storage period, lamb patties were vacuum-packaged and frozen as explained above, until required for analysis.

### 2.3. *In vitro* antioxidant activity of lamb meat patties

The total reducing potential of lamb patties was assayed by FRAP and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays.

The FRAP assay was performed in triplicate. Freeze-dried lamb patties (0.5 g) were homogenised for 2 min at 3000 rpm using a DI 25 basic homogeniser (IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) in 10 mL of 75 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). Homogenates were centrifuged (Universal 32R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) at 5000 rpm for 15 min and supernatants were filtered (FILTER-LAB<sup>®</sup> 1242, Filtros Anioia S.A., Barcelona, Spain) and collected. The antioxidant capacity of the supernatant obtained was determined following the method described by Benzie and Strain (1996). The FRAP activity of samples was calculated using a ferrous sulphate (Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) standard curve (100–1000 µM) and results were expressed as µmol Fe<sup>2+</sup> equivalents/g meat.

The ORAC assay was performed in duplicate following the procedure proposed by Wu et al. (2008) for hydrophilic ORAC assay. The fluorimeter (Jenway 6270 Staffordshire, UK) was programmed to record the fluorescence reading with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm at 1 min intervals for 30 min, with the area under the curve calculated using Microsoft Excel<sup>®</sup> software. The ORAC activity of samples was calculated using a trolox standard curve (6.25, 12.5, 25 and 50 µM) and results were expressed as µmol trolox equivalents (TE)/g meat.

### 2.4. Instrumental colour measurements on lamb meat patties

Instrumental colour parameters were measured using a Minolta CM-2006d spectrophotometer (Minolta Camera Co., Osaka, Japan) in the CIE L\*a\*b\* colour space with a measured area diameter of 8 mm, excluding a specular component, standard illuminant D<sub>65</sub>, observer angle 10° and calibration using a white tile (CM-A145). Triplicate readings were made on three non-overlapping zones of

the sample on day 0, 3, 6 and 9 of the storage period and mean values were calculated. The colour coordinates were expressed as L\* (lightness), a\* (redness) and b\* (yellowness) and chroma (C\*) [Eq. (1)] and hue angle (H\*) [Eq. (2)] were calculated. The rate of discolouration [Eq. (3)] (Van den Oord and Wesdorp, 1971) and total colour change (ΔE) over the storage period (between days 0 and 9) [Eq. (4)] (AMSA, 2012) were also calculated.

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (1)$$

$$H^* = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad (2)$$

$$\text{Rate of discolouration} = A_{580} - A_{630} \quad (3)$$

$$\Delta E_{0-9} = [(L^*_9 - L^*_0)^2 + (a^*_9 - a^*_0)^2 + (b^*_9 - b^*_0)^2]^{1/2} \quad (4)$$

### 2.5. Measurement of lipid oxidation by TBARS in lamb meat patties

Lipid oxidation, assessed as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) value, was determined in duplicate over the storage period (on day 0, 3, 6 and 9) in lamb patties, according to the method described by Maraschiello et al. (1999). Results were expressed as mg malonaldehyde equivalents (MAE)/kg meat.

### 2.6. Evaluation of protein oxidation in lamb meat patties

Protein oxidation in lamb meat patties was evaluated by the formation of carbonyl groups and by the loss of thiol groups.

Protein oxidation evaluation on the basis of the rate of formation of carbonyl groups was assessed in triplicate over the storage period (0, 3, 6 and 9 days) in lamb patties by derivatisation with DNPH following the procedure proposed by Ganhão et al. (2010). Results were expressed as nmol carbonyl groups/mg protein.

Protein oxidation evaluation on the basis of the rate of loss of thiol groups was carried out in triplicate over the storage period (0, 3, 6 and 9 days) in lamb patties by derivatisation with Ellman's reagent (DTNB) following the procedure proposed by Jongberg et al. (2011a). The thiol content was calculated using a molar extinction coefficient of 11,400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Results were expressed as nmol thiol groups/mg protein.

### 2.7. Sensory analysis of cooked lamb meat patties

Sensory evaluation was performed on lamb patties from day 0 and after 3 days of storage, by an eight-member sensory panel. Panellists were trained in the sensory profiling of lamb meat over 10 training sessions. They received additional training in the assessment of specific lamb, fat and oxidised odour and flavour, according to Gasperi et al. (2005). In addition, the sensory panel was trained to assess fish odour and flavour using four samples of minced lamb meat with added fish oil at four different concentrations (0%, 0.05%, 0.1% and 0.2%).

Lamb patties were thawed overnight at 4 °C, wrapped in aluminium foil and cooked in a pre-heated domestic oven (XF0303-TG, Unox, Vigodarzere, Italy) at 175 °C, until an internal temperature of 70 °C was reached. The temperature was measured by a thermocouple probe (K-type thermocouple) inserted into the centre of each patty. Following cooking, samples were wrapped in aluminium foil, labelled with a single random three-digit code and placed in a heated incubator. Panellists assessed eight samples per session, the two storage periods (0 and 3 days) for each of the four treatments, using an unstructured 100-mm line scale, anchored at each end. The sensory descriptors assessed by the panellists were

texture (juiciness, chewiness), odour (lamb, rancid, fish, odd), flavour (lamb, fatty, rancid, fish, odd), and overall liking. Samples were evaluated under red light conditions. The panel members were given unsalted bread and water at room temperature to cleanse their palate between samples.

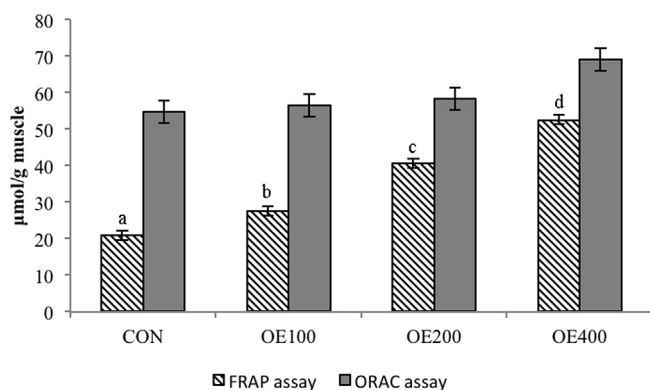
### 2.8. Statistical analysis

Data were analysed using the 9.1.2 Statistical Analysis System package (SAS Institute, Cary, USA.). One-way analysis of variance was performed for antioxidant capacity (FRAP and ORAC) and total colour change ( $\Delta E$ ) data using GLM procedure; treatment was used as the main factor. Instrumental colour parameters, TBARS values, protein carbonyl and thiol groups, and sensory analysis were analysed by two-way analysis of variance using GLM procedure with treatment and storage period used as main factors, and interaction between both factors included in the model. For sensory analysis, the effect of the panellist and the session were also included in the model. When significant differences were observed between main factors, a Student–Newman–Keuls' multiple-range test was used for mean comparison ( $p \leq 0.05$ ). If the interaction between both factors (treatment  $\times$  storage period) was significant, planned comparisons among means were performed using a *t*-test ( $p \leq 0.05$ ).

## 3. Results and discussion

### 3.1. *In vitro* radical scavenging activity of lamb meat patties

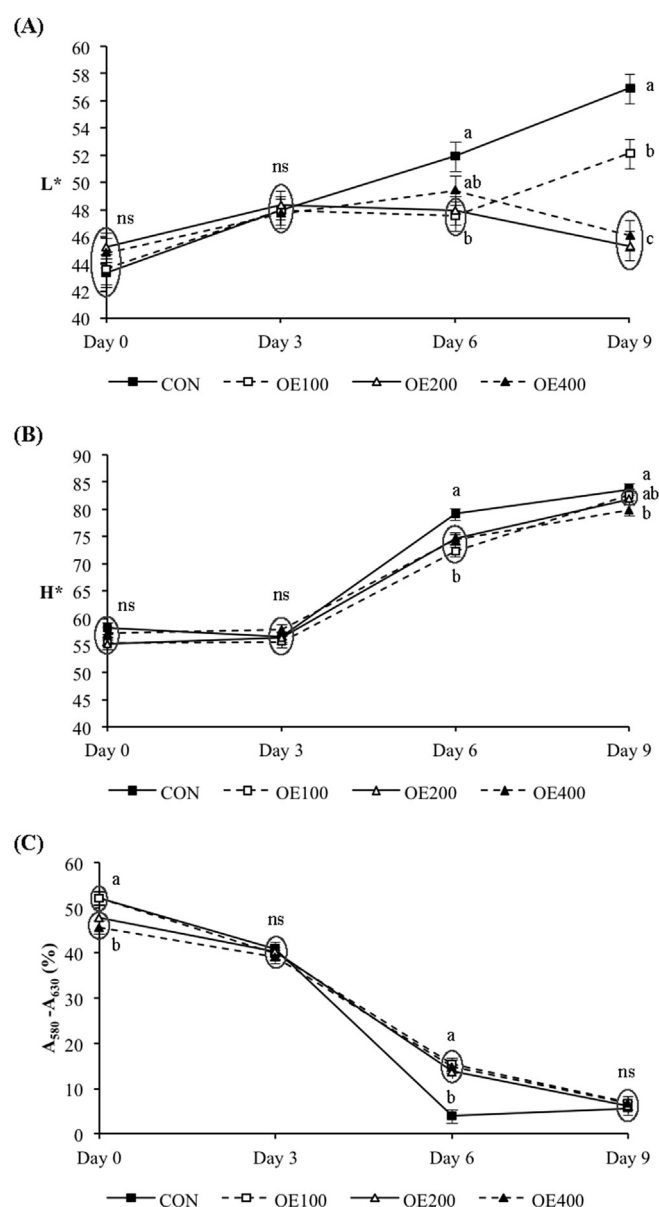
*In vitro* radical scavenging activity of lamb patties at the beginning of storage period (day 0) were determined by FRAP and ORAC assays and is represented in Fig. 2. It is important to test more than one antioxidant capacity method (Frankel and Meyer, 2000) in order to better understand the behaviour of antioxidants. In this case, we tested two different methods: FRAP assay involving electron–transfer reactions and ORAC assay as a method involving hydrogen atom–transfer reactions (Huang et al., 2005). Results of the FRAP assay indicate that the potential of lamb patties to reduce ferric ion was dose-dependent ( $p \leq 0.001$ ), increasing as the concentration of OE in lamb patties increased. This concentration-dependent effectiveness on antioxidant activity of lamb patties was not as clear for the ORAC assay and only a tendency ( $p = 0.089$ ) was found for treatment effect, where OE400 patties showed a higher oxygen radical absorbance capacity in comparison with the other three treatments.



**Fig. 2.** *In vitro* antioxidant capacity, FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  eq/g muscle) and ORAC ( $\mu\text{mol Trolox}$  eq/g muscle), of *n*-3 enriched lamb meat patties containing different levels of olive waste extract (OE). CON: control without OE; OE100: 100 mg GAE/kg muscle; OE200: 200 mg GAE/kg muscle; OE400: 400 mg GAE/kg muscle. Different letters (a–d) indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between treatments. The error bars represent the standard error.

### 3.2. Instrumental colour parameters on the surface of lamb meat patties

Data of the instrumental colour parameters on lamb patties throughout the storage period (0, 3, 6 and 9 days) for the different treatments are shown in Fig. 3. There was an interaction between treatment and storage period for  $L^*$  (lightness) ( $p \leq 0.001$ ),  $H^*$  (hue angle) ( $p \leq 0.05$ ), and the rate of discolouration (measured as  $A_{580} - A_{630}$ ) ( $p \leq 0.001$ ) in lamb patties. Lightness ( $L^*$ ; Fig. 3A) increased in CON patties during the storage period in a more noticeable manner than in OE patties, and the differences were clearer at the end of the storage period (day 9). An increase in  $L^*$  value has been



**Fig. 3.** Instrumental colour parameters of *n*-3 enriched lamb meat patties over 9-day storage in HiOx-MAP, containing different levels of olive waste extract (OE). CON: control without OE; OE100: 100 mg GAE/kg muscle; OE200: 200 mg GAE/kg muscle; OE400: 400 mg GAE/kg muscle. (A) Lightness ( $L^*$ ); (B) hue angle ( $H^*$ ); and (C) rate of discolouration (%). Different letters (a–c) indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between treatments within each storage day. ns: not significant. Values contained by circles are similar ( $p > 0.05$ ). The error bars represent the standard error.

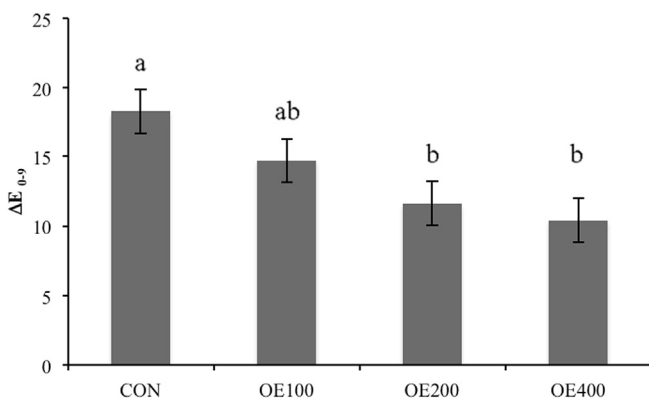
related to increased light scattering caused by changes in the structure of muscle proteins (MacDougall, 1982) as a result of oxidative processes. Hue angle values ( $H^*$ ; Fig. 3B) increased over the storage period on all types of lamb patties, however this increase was lower in OE patties compared to controls from day 6 and onwards. Hue angle is understood as the real colour of a sample (AMSA, 2012) and it was proposed as a good indicator of meat discolouration. Hence, results indicated more colour stability in OE patties compared to CON patties, since the  $H^*$  values were closer to the initial value at the end of storage period. In relation to discolouration rate measured as  $A_{580} - A_{630}$  (Fig. 3C), it was found to be significantly different between treatments on days 0 and 6. On day 0, CON and OE100 patties showed a higher value of  $A_{580} - A_{630}$  than OE200 and OE400 patties, which apparently suggests that the addition of OE had a negative effect on meat colour, increasing its discolouration. Nevertheless, this fact may be a result of the grey colour of the olive extract, which could result in a “diluted effect” as occurs with the fat content of a sample - i.e. the higher the fat content, the lower the absorbance value results (Van den Oord and Wesdorp, 1971) - rather than a discolouration process itself. Data on day 6 of storage, demonstrated that OE patties showed good colour in comparison to CON patties, since the  $A_{580} - A_{630}$  value was higher than 12.5 on the three types of OE patties, which is the proposed acceptability limit for meat colour (Renner and Mazuel, 1985).

The addition of OE to lamb patties significantly stabilised meat colour during the storage period, and it was clearly observed by the results obtained from the total colour change ( $\Delta E$ ) over the storage period, which was lower in OE200 and OE400 patties than CON patties (Fig. 4). This effect on meat colour by OE may be related to some extent to the higher reducing activity of OE patties demonstrated by the FRAP assay (Fig. 2), since discolouration in red meat is generally associated with oxidation of the iron atom within the haem group in red oxymyoglobin, which leads to brownish metmyoglobin (Faustman et al., 2010).

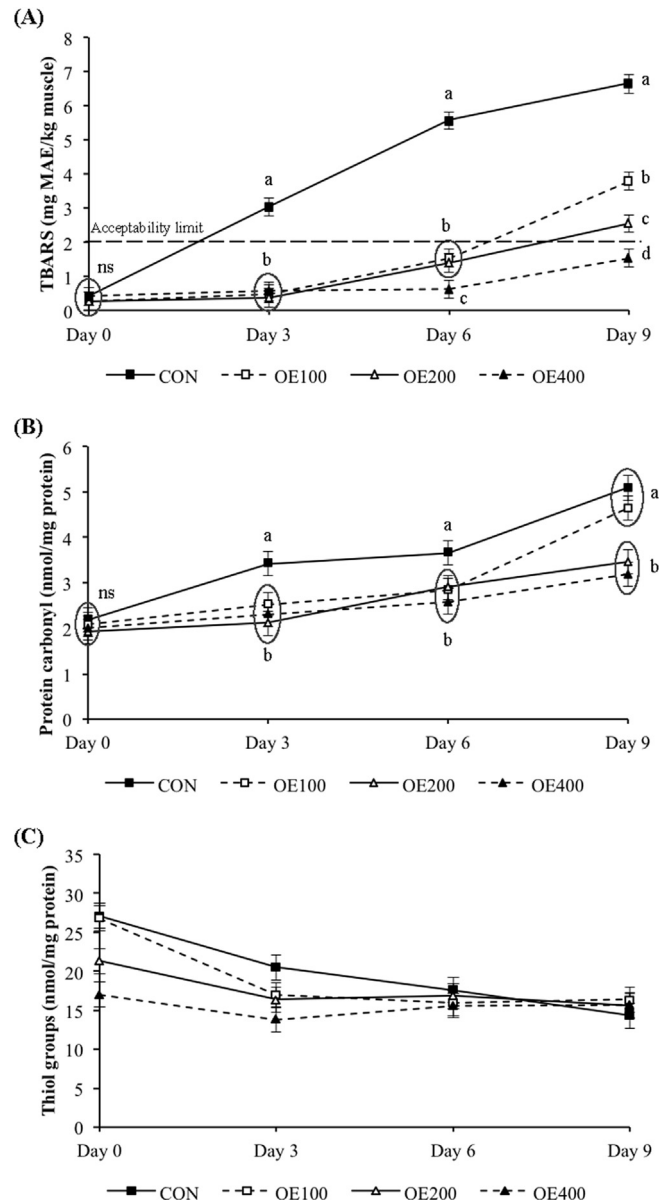
### 3.3. Lipid and protein oxidation in lamb meat patties

Lipid and protein oxidation in lamb patties throughout the storage period (0, 3, 6 and 9 days) for the different treatments are shown in Fig. 5.

An interaction between treatment and storage period ( $p \leq 0.001$ ) was found for lipid oxidation (TBARS values) (Fig. 5A).



**Fig. 4.** Total colour change ( $\Delta E_{0-9}$ ) between days 0 and 9 of storage in HiOx-MAP of *n-3* enriched lamb meat patties containing different levels of olive waste extract (OE). CON: control without OE; OE100: 100 mg GAE/kg muscle; OE200: 200 mg GAE/kg muscle; OE400: 400 mg GAE/kg muscle. Different letters (a–b) indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between treatments. The error bars represent the standard error



**Fig. 5.** Lipid and protein oxidation of *n-3* enriched lamb meat patties over 9-day storage in HiOx-MAP, containing different levels of olive waste extract (OE). CON: control without OE; OE100: 100 mg GAE/kg muscle; OE200: 200 mg GAE/kg muscle; OE400: 400 mg GAE/kg muscle. (A) Lipid oxidation (TBARS) values (mg MAE/kg muscle); (B) protein carbonyl groups (nmol/mg protein); and (C) thiol groups (nmol/mg protein). Different letters (a–d) indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between treatments within each storage day. ns: no significant. Values contained by circles are similar ( $p > 0.05$ ). The error bars represent the standard error.

There were no differences between treatments at the beginning of storage period (day 0). However, from day 3 onwards, TBARS values in CON patties increased greatly in comparison to OE patties, exceeding the acceptability limit of 2 mg of MAE/kg of muscle, used as a marker for the development of rancid off-flavours in meat (Campo et al., 2006). Addition of OE to lamb patties delayed lipid oxidation at all time points and it was found to occur in a dose-dependent manner by the end of the storage period (day 9), with OE400 patties not exceeding the threshold value for rancidity perception during the entire storage period. In line with our results, the use of an olive extract obtained from the wastewater of olive oil cake (mainly rich in HXTYR and TYR), significantly inhibited lipid

oxidation in cooked beef and pork patties stored at 4 °C for 6 days (DeJong and Lanari, 2009). These authors tested two different concentrations, 50 and 100 mg GAE/kg meat, and they also found a strong dose-effect.

In relation to protein oxidation, an interaction between treatment and storage period ( $p \leq 0.001$ ) was observed for protein carbonyl groups (Fig. 5B). Protein carbonylation was not significantly different between treatments on day 0. Nevertheless at day 3 and 6, OE patties showed lower carbonyl groups content than CON patties. At the end of storage period (day 9) patties with the two highest doses of OE (OE200 and OE400 patties) exhibited protein carbonylation resulting in protein oxidation to a lesser extent than OE100 and CON patties. Botsoglou, Govaris, Ambrosiadis, Fletouris, and Papageorgiou (2014) found that the inclusion of an olive leaf extract at levels of 100, 200 and 300 mg GAE/kg meat influenced the concentrations of protein carbonyls in a dose-dependent manner in cooked pork patties enriched with *n*-3 fatty acids. However, in the present study this concentration-dependency was not as clear. The differences between both studies could be the result of the different phenolic profiles of the extracts used and/or due to differences in the chemical composition of the meat used, previously observed by Lund (2007) who reported that beef patties were more prone to protein oxidation than pork patties.

As expected, protein oxidation measured by thiol group determination (Fig. 5C) was affected by storage period ( $p \leq 0.001$ ), decreasing the content of thiol groups from day 0 to day 3. This indicates an increase in protein oxidation but maintaining stable levels between days 3 and 9 of storage period in all patties. Thiol group content was also affected by treatment ( $p \leq 0.05$ ), where OE200 and OE400 patties showed less thiol group content than CON patties, with OE100 patties having an intermediate value. This fact could be interpreted as a pro-oxidative effect of OE on thiol groups. However, it has been observed (Jongberg et al., 2011b) that phenolic compounds with a catechol group (e.g. HXTYR, Fig. 1) may interact with thiol groups forming an adduct that cannot react with the DTNB reagent and, moreover, cannot be susceptible to oxidation.

#### 3.4. Sensory evaluation of cooked lamb meat patties

Data on sensory analysis of cooked lamb patties throughout the storage period are presented in Table 1. The texture of lamb patties was affected by the storage period, with juiciness decreasing and chewiness increasing on day 3 of storage. Both attributes of meat texture can be affected by protein oxidation and might be related to the loss of thiol groups explained earlier, which took place at 3 days of the storage period in the four treatments (Fig. 5C).

An interaction between treatment and storage period was observed on lamb odour and flavour. OE patties showed lower scores for lamb odour on day 3 of the storage period and for lamb flavour at the beginning of storage period (day 0), in comparison to CON patties.

OE patties showed lower scores for fish odour in comparison with CON patties on day 3 of the storage period and fish flavour increased over the storage period in all treatments. To the contrary, OE400 patties showed a lower fish flavour than CON patties, with OE100 and OE200 patties showing intermediate values. Lipid oxidation in meat systems is initiated in cellular membranes where PUFA are located and the sensory consequence of their oxidation is the development of an off-flavour, which is frequently related to rancid flavour (Campo et al., 2006). However, in the current study no differences were observed for rancid odour and flavour, neither during storage period nor between treatments. In this case, long-chain PUFA were added to meat directly as fish oil and they did not incorporate into cell membranes. Therefore the oxidative

reactions occurring over the storage period led to development of fish odour and flavour, which was also observed in PUFA-fortified foods with added fish oils (Ganesan et al., 2014). Hence, the use of antioxidants becomes essential in these kinds of foods to prevent the formation of off-flavours, observed in this study, where the addition of OE to lamb patties retarded in some extent the development of fish odour and flavour in comparison to CON patties. These results are in line with those previously explained regarding lipid oxidation in which OE patties showed a lower degree of TBARS formation compared to CON patties at 3 days of storage period (Fig. 5A).

Odd odour and flavour were affected by treatment, with the highest scores for these attributes found in OE patties. When panellists were asked about the odd odour and flavour that they found in OE patties, they identified olive odour and flavour. This might be the reason why panellists detected less lamb odour and flavour in OE patties with respect to CON patties, since the olive odour and flavour might mask them. The olive extract used in the present study, along with HXTYR and TYR, contain other plant compounds from olive fruits, such as other phenolic compounds, organic acids and aromatic compounds which have an influence on fruity odour and flavour in olive oil (Pastore et al., 2014) consequently they may contribute to the olive odour and flavour found in OE patties. Nevertheless, although panellists detected this odd odour and flavour in OE patties, the overall liking scores did not differ between treatments. Some natural antioxidants used in meat and poultry products, although preventing oxidation processes, also affect sensorial attributes such as colour and flavour (Karre et al., 2013). In this sense, beyond chemical analysis related to oxidative processes, sensory analysis appears to be a prerequisite when a plant extract is tested as an antioxidant in food in order to evaluate its potential use in the food industry.

#### 3.5. Environmental, economic and social impact of using OE added to lamb patties enriched with *n*-3 fatty acids

Spain is the biggest olive oil producer in the world where over 90% of olive oil mills operate with the two-phase centrifugation process. As a result, one of the main environmental issues for the olive oil industry in Spain to deal with is the management of olive wet cake waste. This waste is generated in an amount of 0.8 kg per 1 kg of olives processed (PROSODOL, 2012), and taking into account the productivity of hectares harvested (Camarsa, Gardner, Jones, Eldridge, Hudson, Thorpe, & O'Hara, 2010), more than 4 millions tonnes of olive wet cake are generated in Spain annually. Olive wet cake is an especially harmful-to-the-environment residue due to its phytotoxicity and results difficult to dispose and handle as a consequence of the high moisture content (Roig et al., 2006). For those reasons, there is a need to look for effective approaches in order to manage these wastes properly, reducing environmental problems.

The olive extract used in the present study comes from the olive wet cake. Cake was separated into the liquid and the solid phase (Fernández-Bolaños et al., 2006) so that they can be managed as if they had come from the three phase centrifugation, i.e. the solid phase could be processed for composting or for generating fuel, and the liquid phase could be treated as olive mill wastewater. According to the supplier (GENOSA I + D, S.A.), the olive waste extract is obtained from the latter by physical treatment using no solvents or other chemical products to achieve a 100%-natural extraction. Following the extraction of polyphenols, the remaining liquid part is used for irrigation on olive orchards, would result in closing the cycle of residues-resources. According to Fernández-Bolaños et al. (2006), it is possible to obtain 4–5 kg of hydroxytyrosol with 99.6% of purity from 1000 kg of olive wet cake (70% of moisture),

**Table 1**  
Sensory evaluation<sup>a</sup> of cooked *n*-3 enriched lamb meat patties containing different levels of olive extract (OE) in relation to a 3-day storage period (SP) in HiOx-MAP. CON: control without OE; OE100: 100 mg GAE/kg muscle; OE200: 200 mg GAE/kg muscle; OE400: 400 mg GAE/kg muscle.

	SP Days	Treatment (T)				Mean	SEM	Significance <sup>b</sup>		
		CON	OE100	OE200	OE400			T	SP	TxSP
<b>Texture</b>										
Juiciness	0	46.6	44.9	49.0	49.9	47.6 <sup>a</sup>	10.2	ns	***	ns
	3	35.8	30.9	25.3	37.6	32.5 <sup>b</sup>				
Mean		41.8	37.9	37.2	43.9					
Chewiness	0	26.4	27.8	21.8	21.1	24.4 <sup>b</sup>	9.06	ns	*	ns
	3	30.0	28.7	29.8	29.1	29.6 <sup>a</sup>				
Mean		28.5	28.4	25.8	25.2					
<b>Odour</b>										
Lamb	0	35.1 <sup>a,x</sup>	16.5 <sup>y</sup>	20.5 <sup>a,y</sup>	7.48 <sup>z</sup>	19.9	7.36	***	***	*
	3	23.1 <sup>b,x</sup>	13.8 <sup>y</sup>	8.88 <sup>b,y</sup>	12.4 <sup>y</sup>	14.5				
Mean		29.1	15.2	14.7	10.0					
Rancid	0	1.72	3.64	1.19	0.21	1.65	4.47	ns	ns	ns
	3	2.07	1.15	2.58	1.15	1.71				
Mean		1.90	2.40	1.67	0.72					
Fish	0	6.18 <sup>b</sup>	7.88	2.66 <sup>b</sup>	0.81	3.82	8.30	***	***	**
	3	25.9 <sup>a,x</sup>	2.08 <sup>z</sup>	12.5 <sup>a,y</sup>	5.53 <sup>yz</sup>	11.5				
Mean		16.1	4.98	7.13	2.34					
Odd	0	5.65	38.3	45.0	58.7	36.5	11.2	***	ns	ns
	3	16.0	30.2	37.9	52.0	33.5				
Mean		10.2 <sup>z</sup>	33.8 <sup>y</sup>	41.0 <sup>y</sup>	55.1 <sup>x</sup>					
<b>Flavour</b>										
Lamb	0	36.2 <sup>a,x</sup>	22.9 <sup>y</sup>	22.2 <sup>a,y</sup>	11.1 <sup>z</sup>	23.1	7.09	***	***	**
	3	18.8 <sup>b</sup>	16.3	12.9 <sup>b</sup>	14.8	15.7				
Mean		27.5	19.6	17.6	13.0					
Fatty	0	3.37	4.27	3.15	3.55	3.54	4.17	ns	ns	ns
	3	4.59	2.10	3.84	1.12	2.96				
Mean		3.98	3.19	3.61	2.21					
Rancid	0	0.02	2.29	0.47	0.31	0.77	3.00	ns	ns	ns
	3	1.61	0.13	3.30	0.96	1.48				
Mean		0.81	1.26	1.8	0.62					
Fish	0	5.78	5.50	4.43	0.87	3.70 <sup>b</sup>	9.85	*	***	ns
	3	27.4	12.8	19.7	14.9	18.7 <sup>a</sup>				
Mean		16.6 <sup>x</sup>	9.15 <sup>xy</sup>	12.1 <sup>xy</sup>	7.04 <sup>y</sup>					
Odd	0	15.7	42.5	36.5	56.8	37.4	12.2	***	ns	ns
	3	19.8	29.1	41.0	44.5	33.6				
Mean		17.2 <sup>z</sup>	35.6 <sup>y</sup>	38.3 <sup>y</sup>	50.2 <sup>x</sup>					
<b>Overall liking</b>										
	0	48.2	39.0	43.7	31.1	40.7 <sup>a</sup>	11.0	ns	*	ns
	3	33.1	33.8	27.5	33.5	32.3 <sup>b</sup>				
Mean		40.6	36.9	36.1	32.3					

<sup>a,b</sup>Different superscript letters within the same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

<sup>x,y,z</sup>Different superscript letters within the same row indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

Data without superscripts indicate no significant differences ( $p > 0.05$ ).

<sup>a</sup> Sensory scale: 100-mm unstructured scale.

<sup>b</sup> ns,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

greatly reducing waste accumulation during olive oil production.

Food wastage across the entire supply and consumption chain is another problem of raising awareness due to its environmental, economic and social impact and because of the lack of sufficient and reliable studies assessing the amount of food lost and wasted. According to FAO (2011), meat and meat products losses and waste take place mainly at the retail and consumer level, reaching more than 10% of the European meat production. In Spain, the exact size of the overall problem is not known, but it is estimated that 6% of meat is thrown away at household level because it is never consumed once past the use-by-date (Spanish Ministry of Agriculture, Food and the Environment, 2013). In fact, the expiry date is one of the main reasons for household food waste (Williams et al., 2012). Despite the fact that discarded meat at retail and consumer levels is small, its environmental and economic impacts are high in comparison to other food categories, such as dairy foods, fruits or vegetables (Katajajuuri et al., 2014). It is important to remark that food wasted at the end of the food supply chain has high environmental and economic consequences since it is not only the product wasted, but also natural resources and significant investment used in vain from the farm to the fork, generating

greenhouse gasses and CO<sub>2</sub> emissions, which occurs along meat production system (Nguyen et al., 2010).

Results obtained in this study demonstrated a potential use of the OE as a food antioxidant in lamb meat patties enriched with *n*-3 fatty acids during refrigerated storage because the addition of the extract resulted in the delay of meat discoloration and lipid and protein oxidation. At the point-of-sale, consumer purchase decision criteria are based on the information available regarding meat quality, which can be divided into intrinsic (from the meat product itself) and extrinsic (from the label and type of packaging) quality cues (Grunert, 2006). Appearance, especially meat colour, is the main intrinsic cue used by consumers, while the expiry date information is the main extrinsic cue (Borgogno et al., 2015). Therefore, the addition of OE to lamb patties in the current study, would meet consumer expectations for fresh meat quality at the point of purchase, since changes in meat colour were less noticeable for a longer period and oxidative processes were delayed, both of which influence the expiry date. Hence, taking into account the acceptability limits proposed earlier, consumers would accept OE patties on day 6 of the storage period, while CON patties would have been rejected.

The effort of reducing meat waste is particularly important because global meat consumption is predicted to increase in the next decades by more than 10 kg per capita to reach the value of 49.4 kg/capita estimated for 2050, an increase of 1.3% per annum (Alexandratos and Bruinsma, 2012). The results obtained might result in a reduction of the meat industry annual revenue as a consequence of meat discolouration and annual food wastage due to the expiry date. In this sense, Smith et al. (2000) estimated losses around \$1 billion per annum in the U.S. due to an “unacceptable” meat colour during display.

The findings of this study would include the use of an olive waste extract to increase the shelf life of meat products as a food waste prevention strategy that is considered the most favourable option within the food waste hierarchy (Papargyropoulou et al., 2014) and, at the same time, would valorise agricultural wastes. Therefore, an important reduction of waste generation could be achieved becoming significant when taking into account that Spain generated an amount of 8,297,358 tonnes of waste from animal and vegetable sources in 2012 (EUROSTAT, 2015).

#### 4. Conclusion

Spain, as the main worldwide olive oil producer using the two-phase centrifugation extraction method, is highly affected by the wastage generation during the process, known as olive wet cake. One of the strategies used to manage this waste is the extraction of bioactive compounds, specifically polyphenols. These compounds have great antioxidant properties and can be added to food in order to increase the shelf-life by reducing oxidative processes.

The results obtained indicate the potential use of olive waste extract as natural antioxidant added to lamb meat patties. This application reduced lipid and protein oxidation while maintaining an acceptable colour for a longer time period, representing a 3-day in the shelf-life extension compared to patties without the added the extract.

Therefore, the lamb patties would not only be better considered for overall preference as well as over longer periods of time, but also deal with the current initiatives carried out by governments focused on reducing agricultural and food wastage. On one hand, the potential of olive oil waste use decreases accumulation and encourages the olive oil industry to manage these wastes in an environment-friendly approach. On the other hand, increasing shelf-life of meat products leads to a reduction of food waste, providing economic benefits to the meat industry and diminishing the environmental impact that food waste have along the food supply chain.

#### References

- Alexandratos, N., Bruinsma, J., 2012. World Agriculture Towards 2030/2050: the 2012 Revision. ESA Working Paper No. 12-03. Rome, FAO. Available from: <http://www.fao.org/docrep/016/ap106e/ap106e.pdf>.
- AMSA, 2012. Meat Color Measurement Guidelines. American Meat Science Association and National Livestock and Meat Board. [www.meatscience.org](http://www.meatscience.org).
- Avraamides, M., Fatta, D., 2008. Resource consumption and emissions from olive oil production: a life cycle inventory case study in Cyprus. *J. Clean. Prod.* 16, 809–821.
- Baiano, A., 2014. Recovery of biomolecules from food wastes – a review. *Molecules* 19, 14821–14842.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76.
- Borgogno, M., Favotto, S., Corazzin, M., Cardello, A.V., Piasentier, E., 2015. The role of product familiarity and consumer involvement on liking and perceptions of fresh meat. *Food Qual. Prefer.* 44, 139–147.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, I., Fletouris, D., Papageorgiou, G., 2014. Effect of olive leaf (*Olea europaea* L.) extracts on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties enriched with n-3 fatty acids. *J. Sci. Food Agric.* 94, 227–234.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technol.* 28, 25–30.
- Camarsa, G., Gardner, S., Jones, W., Eldridge, J., Hudson, T., Thorpe, E., O'Hara, E., 2010. LIFE Among the Olives: Good Practice in Improving Environmental Performance in the Olive Oil Sector. Available from: <http://ec.europa.eu/environment/life/publications/lifepublications/lifefocus/documents/oliveoil.pdf>.
- Campo, M.M., Nute, G.R., Hughes, S.I., Enser, M., Wood, J.D., Richardson, R.I., 2006. Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Sci.* 72, 303–311.
- DeJong, S., Lanari, M.C., 2009. Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract. *Food Chem.* 116, 892–897.
- EUROSTAT, 2015. Generation of Waste. Available from: <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do>, accessed October 2015.
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., Suman, S.P., 2010. Myoglobin and lipid oxidation interactions: mechanistic bases and control. *Meat Sci.* 86, 86–94.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Guillén, R., Jiménez, A., 2006. Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas Aceit.* 57, 95–106.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2011. Global Food Losses and Food Waste – Extent, Causes and Prevention. Rome. Available from: <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e.pdf>.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S., 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1925–1941.
- Ganesan, B., Brotherson, C., McMahon, D.J., 2014. Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 98–114.
- Ganhão, R., Morcuende, D., Estévez, M., 2010. Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Sci.* 85, 402–409.
- Gasperi, F., Biasioli, F., Gallerani, G., Fasoli, S., Piasentier, E., 2005. Training of a sensory panel for quantitative descriptive analysis of lamb meat. *Italian J. Food Sci.* 17, 255–268.
- Grunert, K.G., 2006. Future trends and consumer lifestyles with regard to meat consumption. *Meat Sci.* 74, 149–160.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841–1856.
- International Olive Oil Council (IOOC) (2016). Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>, accessed June 2016.
- Jongberg, S., Lund, M.N., Waterhouse, A.L., Skibsted, L.H., 2011a. 4-Methylcatechol inhibits protein oxidation in meat but not disulfide formation. *J. Agric. Food Chem.* 59, 10329–10335.
- Jongberg, S., Skov, S.H., Tørgren, M.A., Skibsted, L.H., Lund, M., 2011b. Effect of white grape extract and modified atmospheres packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. *Food Chem.* 128, 276–283.
- Kanner, J., 1994. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Sci.* 36, 169–189.
- Karre, L., Lopez, K., Getty, K.J.K., 2013. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Sci.* 94, 220–227.
- Katajajuuri, J., Silvennoinen, K., Hartikainen, H., Heikkilä, L., Reinikainen, A., 2014. Food waste in the Finnish food chain. *J. Clean. Prod.* 73, 322–329.
- Lund, M.N., 2007. Protein Oxidation in Meat During Chill Storage. University of Copenhagen, Denmark. Ph.D. Dissertation.
- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., Estévez, M., 2011. Protein oxidation in muscle foods: a review. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 83–95.
- MacDougall, D.B., 1982. Changes in the colour and opacity of meat. *Food Chem.* 9, 75–88.
- Maraschiello, C., Sárraga, C., García Regueiro, J.A., 1999. Glutathione peroxidase activity, TBARS, and  $\alpha$ -tocopherol in meat from chickens fed different diets. *J. Agric. Food Chem.* 47, 867–872.
- Mirabella, N., Castellani, V., Sala, S., 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *J. Clean. Prod.* 65, 28–41.
- Nguyen, T.L.T., Hermansen, J.E., Mogensen, L., 2010. Environmental consequences of different beef production systems in the UE. *J. Clean. Prod.* 18, 756–766.
- Olmedilla-Alonso, B., Jiménez-Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F., 2013. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Sci.* 95, 919–930.
- O'Sullivan, M.G., Kerry, J.P., 2010. Meat packaging. In: Toldrá, F. (Ed.), *Handbook of Meat Processing*. Wiley-Blackwell, Iowa (USA), pp. 247–261.
- Papargyropoulou, E., Lozano, R., Steinberger, J.K., Wright, N., Ujang, Z., 2014. The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste. *J. Clean. Prod.* 76, 106–115.
- Pastore, G., D'Aloise, A., Lucchetti, S., Maldini, M., Moneta, E., Peparario, M., Raffo, A., Sinesio, F., 2014. Effect of oxygen reduction during malaxation on the quality of extra virgin olive oil (Cv. Carboncella) extracted through “two-phase” and “three-phase” centrifugal decanters. *LWT – Food Sci. Technol.* 59, 163–172.
- PROSODOL, 2012. Integrated Strategy of Actions, Measures and Means Suitable for Mediterranean Countries. Analysis of national and European legislative frameworks for Oil Olive Waste and Soil Protection. April 2012. Available from: [http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=home.showFile&rep=file&fil=PRODOSOL\\_Analysis.pdf](http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=home.showFile&rep=file&fil=PRODOSOL_Analysis.pdf).
- Renerre, M., Mazuel, J.P., 1985. Relations entre méthodes de mesures instrumentales et sensorielles de la couleur de la viande. *Sci. des Aliment.* 5, 541–557.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A., 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Manag.* 26, 960–969.
- Salomone, R., Ioppolo, G., 2012. Environmental impacts of olive oil production: a Life Cycle Assessment case study in the province of Messina (Sicily). *J. Clean.*

- Prod. 28, 88–100.
- Shah, M.A., Bosco, S.J.D., Mir, S.A., 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Sci.* 98, 21–33.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Smith, G.C., Belk, K.E., Sofos, J.N., Tatum, J.D., Williams, S.N., 2000. Economic implications of improved color stability in beef. In: Decker, E., Faustan, C., Lopez-Bote, C.J. (Eds.), *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality*. Wiley Interscience, New York, pp. 397–426.
- Spanish Ministry of Agriculture, Food and the Environment, 2013. Spanish Strategy “More Food, Less Waste”. Program to Reduce Food Loss and Waste and Maximise the Value of Discarded Food. Madrid. Available from: [http://www.magrama.gob.es/imagenes/es/Libro%20de%20la%20estrategia\\_ENG\\_baja\\_tcm7-286285.pdf](http://www.magrama.gob.es/imagenes/es/Libro%20de%20la%20estrategia_ENG_baja_tcm7-286285.pdf).
- Torrecilla, J.S., 2010. Phenolic compounds in olive oil mill wastewater. In: Preedy, V.R., Watson, R.R. (Eds.), *Olive and Olives Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier: Academic Press Inc, Amsterdam [etc], pp. 357–365.
- Tsarouhas, P., Achillas, Ch., Aidonis, D., Folinias, D., Maslis, V., 2015. Life Cycle Assessment of olive oil production in Greece. *J. Clean. Prod.* 93, 75–83.
- Van den Oord, A.H.A., Wesdorp, J.J., 1971. Analysis of pigments in intact beef samples. *J. Food Technol.* 6, 1–13.
- Vlyssides, A.G., Loizides, M., Karlis, P.K., 2004. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *J. Clean. Prod.* 12, 603–611.
- Williams, H., Wikström, F., Otterbring, T., Löfgren, M., Gustafsson, 2012. Reasons for household food waste with special attention to packaging. *J. Clean. Prod.* 24, 141–148.
- Wu, C., Duckett, S.K., Neel, J.P.S., Fontenot, J.P., Clapham, W.M., 2008. Influence of finishing systems on hydrophilic and lipophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC) in beef. *Meat Sci.* 80, 662–667.



## **4. Discusión general**



#### **4.1. Empleo de extracto de vino tinto en alimentación animal vs. adición en producto cárnico para conservar la calidad de la carne de cordero enriquecida en ácidos grasos omega-3.**

Con el objetivo de valorar el efecto del extracto de vino tinto (RWE) sobre la estabilidad oxidativa y sensorial de la carne de cordero durante la conservación, se discute comparativamente la suplementación en la dieta de los animales con RWE (Artículo I) y su incorporación en producto cárnico (Artículo II).

En el ANEXO 1 se incluyen las especificaciones del fabricante del RWE con los compuestos fenólicos más representativos en el extracto. Los resultados y la discusión del color instrumental de la carne de corderos suplementados en la dieta con RWE o vitamina E no han sido publicados en el Artículo I, por lo que se presentan en el ANEXO 3 y ANEXO 4, y son expuestos de forma más detallada.

En el Artículo I se estudió el efecto de dos antioxidantes, extracto de vino tinto (RWE) y vitamina E (VE), suplementados en la dieta de los corderos, para ello se estudiaron tres tratamientos experimentales en función del antioxidante incorporado en la dieta: dieta sin antioxidante (grupo C), dieta con 900 mg/kg pienso de RWE (grupo RWE) y dieta con 300 mg/kg pienso de acetato de  $\alpha$ -tocoferilo (grupo VE). Todos los tratamientos recibieron la misma dieta basal rica en ácidos grasos n-3 (6% lino extrusado y 1% de aceite de pescado desodorizado).

En el Artículo II se estudió el efecto de los antioxidantes, extracto de vino tinto (RWE) y vitamina E (TOC), adicionados directamente a la carne de cordero. Para ello se formularon hamburguesas elaboradas a partir de piernas de cordero ligero con aceite de pescado para obtener 100 mg/100 g carne de ácidos grasos de cadena larga (LCh), y se incorporaron distintos antioxidantes dando lugar a los siguientes grupos experimentales: hamburguesas control sin antioxidante (grupo CON); hamburguesas con RWE en una cantidad de 50 mg GAE/kg carne (grupo RWE50), de 100 mg GAE/kg carne (grupo RWE100) o de 200 mg GAE/kg carne (grupo RWE200); y hamburguesas con 100 mg/kg carne de  $\alpha$ -tocoferol (grupo TOC).

*4.1.1. Procesos oxidativos en el músculo y en las hamburguesas de cordero: oxidación lipídica y oxidación proteica*

Se evaluó la progresión de la oxidación lipídica, medida por el incremento de TBARs, y de la oxidación proteica, medida por el incremento de grupos carbonilo. Cuando el RWE fue incorporado en la dieta de los corderos (grupo RWE), los procesos oxidativos, tanto de los lípidos como de las proteínas, aumentaron durante la conservación del mismo modo que en el grupo control (Figura 1 y 2; Artículo I), no observándose, por lo tanto, ningún efecto preventivo en estos fenómenos.

La falta de eficacia del RWE para prevenir los fenómenos oxidativos en la carne cuando es suplementado en la dieta de los corderos, puede estar relacionado con el hecho de que no se encontraron diferencias en el contenido total de compuestos fenólicos con respecto al control, lo que indicaría que los compuestos del RWE no llegaron a depositarse en el músculo (Tabla 2; Artículo I). Los estudios sobre la biodisponibilidad y la absorción de compuestos fenólicos en los rumiantes son muy limitados, y los resultados obtenidos parecen depender principalmente del tipo de compuesto y de la dosis empleada. Así, se ha visto que algunos compuestos fenólicos, como la epicatequina, llegan al plasma (Gladine et al., 2007) y otros, como el ácido carnósico, se depositan en el músculo (Moñino et al., 2008). Sin embargo, otros autores no observaron compuestos fenólicos en plasma e hígado de corderos alimentados con una dieta suplementada con taninos condensados, aunque sí encontraron una mayor capacidad antioxidante en ambos tejidos, así como en el músculo donde la oxidación lipídica se vio reducida (López-Andrés, 2013). Por lo tanto, puede haber un sistema por el que los compuestos fenólicos actúen a nivel gastrointestinal protegiendo los sistemas endógenos de defensa y los compuestos antioxidantes de la dieta (López-Andrés, 2013), lo cual no se ha observado en el Artículo I, al menos reflejado en la estabilidad oxidativa del músculo.

En cuanto a la vitamina E (grupo VE), al ser suplementada en la dieta de los animales, los procesos oxidativos en los lípidos y las proteínas fueron claramente menores en comparación con el control y el grupo RWE durante todo el periodo de conservación (Figura 1 y 2; Artículo I). La suplementación de la dieta de cordero con vitamina E dio lugar a un contenido de  $\alpha$ -tocoferol en carne de 2,42  $\mu\text{g/g}$  carne (Tabla 2, Artículo I), el cual supera los valores propuestos por Álvarez, De la Fuente, Díaz, Lauzurica, Pérez y Cañeque (2008) (1,87-2,37  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -tocoferol/g carne) para reducir de forma efectiva la oxidación lipídica durante largos periodos de conservación. En el tejido, el  $\alpha$ -tocoferol se encuentra protegido en las membranas celulares situado en una posición “estratégica” cerca de los PUFA, donde puede realizar su actividad interrumpiendo la propagación de

la oxidación lipídica mediante la neutralización de radicales peroxilo (Niki y Noguchi, 2004), resultando, por lo tanto, muy efectivo cuando se suministra en la dieta.

La incorporación del RWE en las hamburguesas de cordero, redujo los valores de TBARs comparados con el control, aunque no se encontró ningún efecto de la adición del RWE en el contenido de grupos carbonilo, que aumentaron durante la conservación en todos los grupos (Tabla 2; Artículo II).

Los compuestos fenólicos presentes en el RWE (ANEXO 1) tienen gran potencial para ceder átomos de hidrógeno/electrones, ya que presentan numerosos grupos hidroxilo en su molécula (Rice-Evans et al., 1997), como es el caso de la catequina, epicatequina o las proantocianidinas. Por lo tanto, funcionan como buenos antioxidantes para interrumpir la reacción en cadena de la oxidación lipídica como se ha visto en los valores de TBARs en las hamburguesas RWE. Estos compuestos muestran también capacidad quelante de metales, al poseer grupos catecol en su estructura (Leopoldini et al., 2004; Rice-Evans et al., 1997), como el ácido clorogénico; sin embargo, esta capacidad no fue suficiente para frenar la formación de grupos carbonilo que son generados principalmente por procesos de oxidación en los que intervienen metales (Estévez, 2011).

Por el contrario, en las hamburguesas TOC la oxidación aumentó, tanto la lipídica como la proteica, llegando a observarse valores de TBARs superiores a los hallados en el control y en las hamburguesas RWE tras 9 días de conservación (Tabla 2; Artículo II).

Cuando el  $\alpha$ -tocoferol se encuentra situado fuera de su posición fisiológica, como es en el caso en las hamburguesas TOC en comparación con la suplementación de la dieta con vitamina E, su efecto no resulta tan efectivo. De hecho, el  $\alpha$ -tocoferol añadido *postmortem* se incorpora sólo a la fracción neutra de los lípidos, por lo que su efecto es considerablemente menor en comparación con su uso en alimentación animal (Ahn et al., 2002). Además, el proceso del picado de la carne durante la elaboración de las hamburguesas expone más superficie a la acción del oxígeno y, rompe las membranas celulares liberando al medio radicales libres, metales y otros compuestos que promueven la oxidación (como el  $H_2O_2$ ), convirtiendo el sistema en un ambiente altamente oxidable. Durante la acción antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol, al neutralizar los radicales peroxilo provenientes de la oxidación de los PUFA se genera un radical tocoferilo que es muy estable y suele ser reducido por otros componentes biológicos,

como la vitamina C, reciclando el  $\alpha$ -tocoferol (Niki y Traber, 2012; Figura 5). Pero en algunas ocasiones, como cuando hay elevada acumulación de estos radicales como consecuencia de procesos oxidativos intensos, estos radicales puede reaccionar con otras moléculas biológicas, como PUFA intactos (Niki y Noguchi, 2004, Figura 5), propagando el proceso de autooxidación lipídica, pudiendo ser éste el motivo del mayor valor de TBARs observado a día 9 en las hamburguesas TOC.

##### *4.1.2. Parámetros instrumentales de color en el músculo y en las hamburguesas de cordero*

En el estudio sobre la incorporación de los antioxidantes en la dieta de cordero, se observó una interacción entre la dieta y el periodo de conservación para todos los parámetros de color estudiados ( $L^*$ ,  $a^*$  y hue angle) (ANEXO 3) y para el porcentaje de MetMb (ANEXO 4) en el músculo, que consistió en una mayor estabilidad del color a lo largo de la conservación en la carne del grupo VE en comparación con los grupos C y RWE.

El índice de luminosidad ( $L^*$ ) aumentó durante la conservación en el grupo RWE del mismo modo que en el grupo control, lo cual se relaciona con un aumento de la dispersión de la luz (aumentando la luminosidad) como consecuencia de cambios estructurales en las proteínas miofibrilares debido a procesos oxidativos (McDougall, 1982), lo cual podría tener relación con una mayor oxidación proteica en la carne de este grupo, como se ha indicado anteriormente (Figura 2; Artículo I). Por el contrario, este parámetro no sufrió cambios durante la conservación en el grupo VE pudiendo relacionarse con una menor oxidación proteica en esta carne. El índice de rojo ( $a^*$ ) aumentó durante los 6 primeros días de conservación en los grupos C, RWE y VE, como consecuencia de la oxigenación de la mioglobina dando lugar al color rojo brillante característico de la carne (Macini y Hunt, 2005), lo cual se vio favorecido por el envasado en HiOx-MAP (McMillin, 2008). Sin embargo, este nivel alto de oxígeno también crea condiciones oxidativas que afectan negativamente a la estabilidad del color durante periodos largos de conservación (Kim, Huff-Lonergan, Sebranek y Lonergan, 2010), lo cual se observó en el descenso del parámetro  $a^*$  en la segunda mitad del periodo de conservación en los grupos C y RWE, sin presentar cambios en el grupo VE resultando en valores mayores al final de la conservación. La tonalidad (hue angle) de la carne del grupo RWE y del control sufrió un incremento de su valor durante la conservación, indicando un cambio en el color que va de tonos rojos a tonos

amarillentos debido a la oxidación de la oximioglobina a MetMb (Mancini y Hunt, 2005), lo cual pudo observarse en el grupo RWE y en el control donde el porcentaje de MetMb aumentó, mientras que en el grupo VE su valor permaneció estable durante la segunda mitad de la conservación.

La decoloración que tuvo lugar durante el periodo de conservación indica que la suplementación de la dieta de los corderos con RWE no previno los fenómenos de deterioro de la calidad de la carne, posiblemente porque los compuesto fenólicos del extracto no llegaron a depositarse en el músculo. Aunque algunos autores encontraron un efecto positivo en el color de la carne de corderos suplementados en la dieta con compuestos fenólicos, sin encontrar efecto en la estabilidad lipídica (Luciano et al., 2009), en el caso de la carne del grupo C y RWE parece que los procesos oxidativos están relacionados, al encontrarse mayor oxidación lipídica, proteica y decoloración. Por el contrario, en la carne del grupo VE, los procesos oxidativos fueron menores, tanto la oxidación lipídica y proteica, como la decoloración, de forma que parece que la acción de la vitamina E en la interrupción de los procesos de oxidación lipídica influyeron positivamente en la estabilidad del color de la carne. De hecho, el valor propuesto por Álvarez et al. (2009) del contenido de  $\alpha$ -tocoferol en carne necesario para frenar los procesos oxidativos en los lípidos, es aplicable también a la prevención de la oxidación de la mioglobina.

Cuando el RWE se adicionó a las hamburguesas, se observó que el color se mantuvo más estable durante la conservación en comparación con las hamburguesas control, y además las hamburguesas RWE presentaron un porcentaje de MetMb más bajo (Tabla 1; Artículo II). Este efecto en el color se apreció claramente en los valores obtenidos de la diferencia total del color ( $\Delta E_{0.9}$ ) durante el periodo de conservación (Figura 2; Artículo II), siendo más patente en las hamburguesas RWE200. En las hamburguesas RWE parece haber una relación entre una menor intensidad de la oxidación lipídica y una menor decoloración de la carne, aunque las relaciones entre los diferentes procesos de oxidación en la carne aún no están claras del todo, encontrándose disparidad de resultados (Faustman et al., 2010).

En cambio cuando se adicionó la vitamina E a las hamburguesas (hamburguesas TOC), se observó un aumento de la decoloración durante la conservación de forma similar a las hamburguesas control, aumentando el porcentaje de MetMb incluso por encima de los valores encontrados en las hamburguesas CON, en el día 9 de la conservación (Tabla 1; Artículo II). Este efecto en la MetMb puede deberse a la elevada intensidad de

la oxidación lipídica que tuvo lugar al final de la conservación, de tal forma que los productos de la oxidación pudieron atacar a la mioglobina, oxidándola (Faustman et al., 2010).

Los estudios relacionados con la inclusión de  $\alpha$ -tocoferol en carne picada ofrecen resultados muy variados, así por ejemplo en el estudio de Vissa y Cornforth (2006) la incorporación de 50 o 100 ppm de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en carne picada de ternera no afectó a la estabilidad lipídica ni al color durante la conservación en HiOx-MAP; mientras que la adición de 50 ppm de  $\alpha$ -tocoferol a hamburguesas de cerdo enriquecidas con PUFA n-3 y sometidas a un proceso de cocinado, previno la oxidación lipídica y proteica durante la conservación en refrigeración (Botsoglou et al., 2014). Por otro lado, la inclusión de dosis altas de  $\alpha$ -tocoferol (0,05% y 0,1%) en carne de ternera picada y cocinada, promovió la oxidación lipídica (Ahn et al., 2002). Por lo tanto, parece que el efecto de la adición de  $\alpha$ -tocoferol *postmortem* depende de la cantidad usada, del tipo de envase, del procesado del producto, del tipo de carne... lo que hace complicado realizar comparaciones entre estudios.

##### 4.1.3. Porcentaje de ácidos grasos n-3 en el músculo y en las hamburguesas de cordero

Los porcentajes de los PUFA LCh en la carne al inicio de la conservación, fueron numéricamente mayores cuando se incorporó el RWE en la dieta de los corderos, observándose diferencias significativas en una mayor proporción de EPA y una menor relación n-6/n-3 en comparación con la carne control (Tabla 3; Artículo I). Por tanto, la incorporación de RWE en la dieta mejoró el perfil lipídico de la carne, dando lugar a una carne más saludable desde el punto de vista nutricional. Esta mayor deposición de los PUFA LCh en la carne del grupo RWE podría deberse a una interferencia de los compuestos fenólicos en el proceso de biohidrogenación en el rumen, ya que algunos estudios han puesto de manifiesto que los compuestos fenólicos pueden reducir la biohidrogenación de los PUFA (Jafari, Meng, Rajion, Jahromi y Ebrahimi, 2016), dando lugar a una mayor deposición de estos ácidos grasos en el músculo (Vasta, Mele, Scerra, Luciano, Lanza y Priolo, 2009).

En la carne del grupo VE, el porcentaje de PUFA LCh y de DPA fue mayor a día 9 de conservación y el porcentaje de DHA fue globalmente mayor que en la carne del grupo C (Tabla 3; Artículo I). Este mayor porcentaje se debe a una protección frente a la oxidación de estos ácidos grasos durante el periodo de conservación, lo cual se relaciona con todos los resultados discutidos anteriormente sobre la estabilidad

oxidativa en la carne del grupo VE. El hecho de que la vitamina E se hubiera depositado en las membranas celulares (Niki y Noguchi, 2004), donde se encuentran los PUFA LCh, hace que pudiera ejercer un efecto protector de una forma más directa, además de que los procesos oxidativos (oxidación lipídica, oxidación proteica y oxidación de la mioglobina) en esta carne fueron menores.

En relación a la adición del RWE a las hamburguesas de cordero, el contenido de EPA y DHA resultó mayor en las hamburguesas RWE200 al final de la conservación en comparación con las hamburguesas control, presentando las hamburguesas RWE50 y RWE100 valores intermedios (Tabla 3; Artículo II). Este efecto protector podría relacionarse con el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos presentes en el RWE, en relación a la capacidad de quelar de metales, la capacidad reductora y la capacidad neutralizadora de radicales libres (Rice-Evans et al., 1997), que consigue una mayor estabilidad oxidativa en las hamburguesas (como se ha explicado anteriormente), de forma que los PUFA LCh no habrían sido atacados con la misma intensidad que en las hamburguesas control.

Por el contrario, en las hamburguesas TOC el contenido en EPA y DHA no difirió del encontrado en las hamburguesas CON, posiblemente debido a la intensidad de los procesos oxidativos explicados en los apartados anteriores, que aumentarían la susceptibilidad de los PUFA LCh a ser atacados por las especies reactivas.

#### 4.1.4. Evaluación sensorial de las chuletas y de las hamburguesas de corderos

La incorporación de RWE en la dieta no afectó a los parámetros sensoriales estudiados (Tabla 4; Artículo I). Pero los atributos de calidad, como el olor y sabor a cordero disminuyeron, y atributos negativos como el olor y el sabor a pescado y a rancio, aumentaron durante la conservación, posiblemente como consecuencia de los procesos oxidativos que tuvieron lugar en esta carne, ya que la oxidación lipídica da lugar a compuestos volátiles que originan olores y sabores desagradables (Campo et al., 2006). La carne del grupo VE recibió mejores puntuaciones por parte del panel de cata con respecto al grupo control y al grupo RWE. La menor intensidad de los procesos oxidativos en esta carne dio como resultado que la puntuación para los atributos de olor y sabor a cordero fuera mayor, y las puntuaciones para el olor y el sabor a rancio y a pescado resultaran menores, obteniendo, por consiguiente, una mejor valoración global tras 6 días de conservación (Tabla 4; Artículo 1).

En las hamburguesas RWE200, la incorporación del RWE, a diferencia de lo que ocurrió en el caso de la suplementación en la dieta, dio lugar a la aparición de un olor extraño, que posiblemente fue la causa de una menor puntuación para el olor a cordero. Este olor se relacionó por parte de los panelistas con matices a vino tinto, de modo que la incorporación del RWE modificó el atributo de olor en las hamburguesas. La aparición de olores o sabores como resultado de la incorporación de antioxidantes naturales procedentes de extractos o derivados de las frutas y plantas, se ha visto anteriormente en varios estudios (Karre et al., 2013). El resto de atributos de sabor (cordero, grasa, rancio, pescado y extraño) y la valoración global no se vieron afectados por la incorporación del RWE en la formulación de las hamburguesas (Tabla 4; Artículo II). Por el contrario, la adición de  $\alpha$ -tocoferol en las hamburguesas de cordero no modificó las puntuaciones del panel de cata en ninguno de los atributos sensoriales estudiados con respecto al control (Tabla 4; Artículo II).

## **4.2. Empleo de antioxidantes naturales en producto cárnico enriquecido en ácidos grasos omega-3 para conservar su calidad: extracto de vino vs. extracto de aceituna**

En esta parte de la discusión general se compara el efecto de dos extractos ricos en polifenoles, extracto de vino tinto (RWE) y extracto de aceituna (OE) sobre la estabilidad oxidativa y sensorial de hamburguesas de cordero durante la conservación.

En el ANEXO 1 y en el ANEXO 2 se adjuntan las especificaciones del fabricante del RWE y del OE, respectivamente, con los compuestos fenólicos más representativos en cada extracto. El RWE presentó ácidos fenólicos, estilbenos, catequinas y proantocianidinas. El OE presentó mayoritariamente alcoholes fenólicos (hidroxitirosol y tirosol) y en menor medida flavonoides. Los resultados del contenido en PUFA LCh en las hamburguesas formuladas con el OE, no han sido publicados en el Artículo III, por lo que se presentan en el ANEXO 5.

En el Artículo II y III se estudió el efecto de los antioxidantes, extracto de vino tinto (RWE) y extracto de aceituna (OE), adicionados a la carne de cordero. Para ello se formularon hamburguesas elaboradas a partir de piernas de cordero ligero con aceite de pescado para obtener 100 mg/100 g carne de LCh, y los antioxidantes se incorporaron a distintos niveles.

En el Artículo II los grupos experimentales fueron los siguientes: hamburguesas control sin antioxidante (grupo CON); hamburguesas con RWE en una cantidad de 50 mg GAE/kg carne (grupo RWE50), 100 mg GAE/kg carne (grupo RWE100), y 200 mg GAE/kg carne (grupo RWE200).

Los grupos experimentales en el Artículo III fueron: hamburguesas control sin antioxidante (grupo CON); hamburguesas con OE en una cantidad de 100 mg GAE/kg carne (grupo OE100), 200 mg GAE/kg carne (grupo OE200), y 400 mg GAE/kg carne (grupo OE400).

Durante la discusión se compara el efecto que presentaron los extractos al ser incorporados al mismo nivel, de modo que la discusión se basa en valorar el efecto de los extractos empleados en las mismas dosis (100 y 200 mg GAE/kg carne), sobre el mismo tipo de carne (pierna de cordero), en las mismas condiciones (HiOx-MAP a 4 °C) y durante el mismo periodo de conservación (9 días).

##### *4.2.1. Capacidad antioxidante in vitro de las hamburguesas de cordero: ensayo FRAP y ensayo ORAC*

Existen diferentes ensayos químicos para determinar el mecanismo antioxidante de un compuesto basándose en diferentes propiedades químicas. En los trabajos que aquí se presentan se han escogido dos tipos de técnicas: el ensayo FRAP y el ensayo ORAC.

El ensayo FRAP evalúa el potencial redox de un compuesto sin la intervención de radicales libres. El mecanismo de acción que mide este ensayo es la capacidad reductora de un compuesto a través de su habilidad de ceder electrones, por lo que es un ensayo basado en reacciones de transferencia de electrones (ET). El potencial reductor de un antioxidante es un indicador importante de su efectividad y, en este caso, se cuantificó la capacidad de reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (Shahidi y Zhong, 2015).

En los resultados obtenidos a través del ensayo FRAP, se observó que las hamburguesas OE100 y OE200 presentaron mayor capacidad reductora respecto a su control (Figura 2; Artículo III), mientras que en las hamburguesas RWE100 y RWE200 no se observaron diferencias significativas con el control (Figura 1; Artículo II). Los distintos resultados obtenidos en el ensayo FRAP podrían deberse a diferencias cualitativas en el contenido de los compuestos fenólicos que se presentan en ellos, ya que el contenido en polifenoles totales fue el mismo (100 y 200 mg GAE/kg carne). En este sentido, en un estudio sobre la capacidad de ceder electrones de varios compuestos fenólicos presentes en el OE y RWE (Leopoldini, Marino, Russo y Toscano, 2004) se observó que el potencial de ionización se incrementaba en el siguiente orden: ácido gálico < tirosol < hidroxitirosol < epicatequina < resveratrol. Aunque el resveratrol y la epicatequina aparecen como compuestos con una mayor habilidad para ceder electrones que el hidroxitirosol y el tirosol, estos compuestos se encuentran en una baja proporción en el RWE (ANEXO 1), mientras que el hidroxitirosol es el compuesto mayoritario del OE seguido del tirosol (ANEXO 2), lo que pudo llevar a que la capacidad reductora resultara más patente en las hamburguesas a las que se les incluyó el OE.

El ensayo ORAC mide la capacidad de un compuesto de donar átomos de hidrógeno (reacción de transferencia de átomos de hidrógeno – HAT) para poder frenar la reacción en cadena de los procesos oxidativos inducidos por un radical peroxilo ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) (Shahidi y Zhong, 2015). Estos radicales libres se generan durante la oxidación lipídica en los alimentos, por lo que se considera que tiene cierta relevancia desde el punto de vista

biológico y que los resultados pueden aportar información sobre la efectividad del antioxidante (Shahidi y Zhong, 2015).

En los resultados obtenidos para el ensayo ORAC no se observaron diferencias entre las diferentes hamburguesas OE100, OE200 (Figura 2; Artículo III), RWE100 y RWE200 (Figura 1; Artículo II) respecto a sus controles. Sin embargo, está reconocido que uno de los principales mecanismos de acción de los polifenoles es la cesión de átomos de hidrógeno desde sus grupos hidroxilo (Shahidi y Naczk, 2004b), de hecho, el número y posición de estos grupos hidroxilo es una de las principales características estructurales para poder llevar a cabo su actividad antioxidante (Rice-Evans et al., 1996; Rice-Evans et al., 1997). Una explicación a la ausencia de diferencias en el ensayo ORAC es la posible interacción de los compuestos fenólicos con los metales que se encuentran en la muestra (Nkhili y Brat, 2011) que, en este caso al tratarse de carne picada, estos metales (principalmente el hierro) estarían asequibles a los compuestos fenólicos. Por un lado, aquellos compuestos que tengan capacidad reductora pueden actuar sobre los metales reduciéndolos y haciéndolos más reactivos, de modo que los procesos oxidativos sobre el radical peroxilo se aceleran y el valor de ORAC resulta más bajo. Por otro lado, los antioxidantes con capacidad para quelar los metales (aquellos con un grupo catecol: hidroxitirosol, catequina, epicatequina, procianidinas y ácido clorogénico) pueden unirse a ellos formando complejos, de modo que las posiciones de cesión de átomos de hidrógeno no estarían disponibles para actuar contra los radicales peroxilo del ensayo, dando valores más bajos de ORAC y, por lo tanto, subestimando la habilidad de los antioxidantes de ceder átomos de hidrógeno y neutralizar los radicales (Nkhili y Brat, 2011).

Los ensayos *in vitro* de las reacciones de HAT o ET nos pueden proporcionar mucha información respecto a los mecanismos de actuación de los antioxidantes. Sin embargo, los resultados obtenidos no siempre coinciden con la capacidad real de un antioxidante para prevenir o frenar los procesos oxidativos en moléculas biológicas como los lípidos y las proteínas (Niki, Omata, Fukuhara, Saito y Yoshida, 2008). De hecho, la actuación de un antioxidante frente a los procesos oxidativos depende de su capacidad de neutralizar radicales, de reducir compuestos o de quelar metales según el agente oxidante, así como de su capacidad de interactuar con otros compuestos prooxidantes y antioxidantes, y de su localización física en el sistema (fase acuosa o lipídica) que le

permita acceder en mayor o menor medida a las especies reactivas (Alamed, Chaiyasit, McClements y Decker, 2009).

##### *4.2.2. Procesos oxidativos en las hamburguesas de cordero: oxidación lipídica y proteica*

En relación a la oxidación lipídica, ambos extractos (RWE y OE) incorporados en las hamburguesas de cordero, resultaron altamente eficaces como antioxidantes previniendo la formación de TBARs durante todo el periodo de conservación comparado con sus controles (Tabla 2; Artículo II y Figura 5; Artículo III). Este efecto se ha visto incluso en las hamburguesas formuladas con la dosis más baja de RWE (50 mg GAE/kg carne). De modo que, independientemente de los resultados obtenidos en las hamburguesas mediante los ensayos ORAC y FRAC, la incorporación del RWE y el OE en las hamburguesas de cordero redujo la oxidación lipídica, posiblemente por la capacidad de los compuestos presentes en los extractos de ceder átomos de hidrógeno y/o electrones, de modo que pudieron intervenir en el proceso de autooxidación lipídica. Los antioxidantes que emplean este mecanismo de acción se conocen como antioxidantes *chain-breaking* (Laguerre, Lecomte y Villeneuve, 2007), porque “rompen” la reacción en cadena de la oxidación al neutralizar radicales libres intermediarios, y se clasifican como antioxidantes primarios (Shahidi y Zhong, 2010). De esta forma se reduce la formación de productos de oxidación secundarios que incluyen compuestos volátiles como aldehídos, cetonas y alcoholes que son los responsables de los aromas y sabores asociados a la rancidez (Frankel, 2005). Según Campo et al. (2006), un valor de TBARs de 2 mg equivalentes de malondialdehído (MAE)/kg carne sería el límite a partir del cual la cantidad de compuestos volátiles provenientes de la oxidación de los lípidos sería detectada por el consumidor, enmascarando el sabor propio de la carne, por lo tanto reduciendo su calidad organoléptica y también su calidad nutricional (Kanner, 2007). En este sentido, todas las hamburguesas RWE presentaron valores de TBARs aceptables durante los primeros 3 días de conservación, y las hamburguesas RWE200 tuvieron valores por debajo del límite de detección hasta los 6 días de conservación. A día 9, los valores de TBARs en las hamburguesas RWE200 fueron inferiores a los encontrados en las hamburguesas RWE50 y RWE100, aunque superando los 2 mg MAE/kg carne. El efecto de la incorporación de OE en las hamburguesas resultó más patente, y se observó una clara relación dosis-efecto en el día 9 del periodo de conservación. Todas las hamburguesas OE mantuvieron unos niveles de TBARs por

debajo del límite de detección de la rancidez durante 6 días, y las hamburguesas OE400 presentaron valores dentro del límite de aceptabilidad hasta el final de la conservación (9 días). Aunque los dos extractos utilizados para formular las hamburguesas presentaron una gran capacidad para prevenir los procesos oxidativos de los lípidos, el efecto en las hamburguesas OE se observó durante más tiempo que en el caso de las hamburguesas RWE, lo cual podría estar relacionado con la mayor habilidad de ceder electrones del OE (ensayo FRAP).

En relación a la oxidación de proteínas, tanto los grupos carbonilo como los grupos tiol no estuvieron afectados por la incorporación del RWE en las hamburguesas (Tabla 2; Artículo II). Sin embargo, las hamburguesas con OE presentaron una menor cantidad de grupos carbonilo que su control durante 6 días de conservación (Figura 5; Artículo III). Pasados 9 días en refrigeración las hamburguesas OE200 y OE400 todavía presentaron valores más bajos que las hamburguesas CON y OE100. Los grupos carbonilo se forman principalmente en las proteínas miofibrilares de la carne por medio de reacciones de oxidación catalizadas por metales (Estévez, 2011), por lo tanto, un mecanismo para contrarrestar estos fenómenos oxidativos es a través de la quelación o inactivación de los metales que intervienen en estos procesos. En este sentido, se ha visto que el hidroxitirosol presenta propiedad quelante que inhabilitan a los metales para iniciar la oxidación (Napolitano, De Lucia, Panzella y d'Ischia, 2010). De modo que la incorporación del OE pudo prevenir la formación de grupos carbonilo en las hamburguesas mediante este mecanismo. Los grupos tiol también se vieron afectados por la incorporación de OE en las hamburguesas donde se observó que las hamburguesas OE200 y OE400 presentaron un contenido más bajo de forma global respecto al resto de hamburguesas (Figura 5; Artículo III). La técnica empleada para medir la oxidación proteica mediante el reactivo de Ellman cuantifica la pérdida de grupos tiol como consecuencia de los procesos oxidativos, de modo que un contenido menor indicaría una mayor intensidad de oxidación en la muestra. No obstante, se ha demostrado que los compuestos fenólicos con grupos catecol, como es el caso del hidroxitirosol, pueden interactuar con los grupos tiol dando lugar a complejos que no serían medibles mediante el reactivo de Ellman (Jongberg, Gislason, Lund, Skibsted y Waterhouse, 2011). Por lo tanto, un menor contenido de los grupos tiol en las hamburguesas OE200 y OE400 podría deberse a la formación de estos complejos,

teniendo en cuenta el efecto antioxidante que tuvo lugar en estas hamburguesas sobre la oxidación lipídica y el contenido en carbonilos.

##### *4.2.3. Parámetros instrumentales de color en las hamburguesas de cordero*

Los parámetros instrumentales de color estuvieron afectados por la incorporación del RWE o del OE en las hamburguesas, pero el efecto varió ligeramente según el extracto, aunque en términos generales se previno la decoloración de las hamburguesas con ambos extractos.

Así por ejemplo, el índice de rojo ( $a^*$ ) estuvo afectado por la incorporación del RWE de modo que las hamburguesas RWE100 y RWE200 mantuvieron valores más elevados del parámetro  $a^*$  en la segunda mitad de la conservación, en comparación con las hamburguesas RWE50 y su control (Tabla 1; Artículo II). Pero en las hamburguesas OE, este parámetro no estuvo afectado por la inclusión del extracto ( $p > 0,05$  para el efecto tratamiento; dato no incluido en el Artículo III). En cuanto a la luminosidad ( $L^*$ ), las hamburguesas RWE200 tuvieron un valor menor en comparación con su control a día 6, mientras que las hamburguesas OE100, OE200 y OE400 mantuvieron este valor menor hasta el día 9 respecto a su control. El cambio de tonalidad ( $H^*$ ) durante toda la conservación fue menor para las hamburguesas RWE100 y RWE200 en relación a su control, mientras que sólo las hamburguesas adicionadas con la mayor dosis de OE (hamburguesas OE400) presentaron un valor de  $H^*$  inferior al control hasta el final de la conservación (día 9).

Por lo tanto, la incorporación del RWE o del OE en las hamburguesas de cordero previno la decoloración, lo cual se observa de una forma más clara en los resultados obtenidos de la diferencia total del color durante el periodo de conservación ( $\Delta E_{0-9}$ ) (Figura 2; Artículo II y Figura 4; Artículo III). De estos resultados se extrae que las dosis de 200 mg GAE/kg carne de ambos extractos (hamburguesas RWE200 y OE200) previno la decoloración de las hamburguesas en comparación con sus respectivos controles, y que con la dosis de 100 mg GAE/kg carne (hamburguesas RWE100 y OE100) aunque también se previno la decoloración, el efecto fue claramente inferior.

Es importante comentar que el propio color de los extractos tuvo efecto en el color de las hamburguesas a tiempo inicial, pero éste no se mantuvo a lo largo de la conservación. En el caso de la adición del RWE, el índice de rojo fue menor en las hamburguesas RWE100 y RWE200 en relación a su control, y cuando se adicionó el

OE en las hamburguesas la relación  $A_{580}$ - $A_{630}$  fue menor que en el control para las hamburguesas OE200 y OE400. Las alteraciones del color de un producto final debido a la incorporación de extractos de frutas en su formulación (por ejemplo de la uva o de la granada) han sido observadas también en otros estudios (Karre et al., 2013).

Independientemente de las diferencias encontradas en el empleo del RWE o del OE para cada parámetro de color individualmente, ambos afectaron positivamente al mantenimiento del color de las hamburguesas durante la conservación, siendo necesaria una dosis mínima de 200 mg GAE/kg carne. La prevención de los procesos de decoloración en los productos cárnicos es de gran importancia para la industria alimentaria, ya que la primera característica por la que el consumidor se guía para hacer su elección de compra es la apariencia, donde el color juega un papel fundamental (Carpenter et al., 2001). Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta característica tiene menos importancia en las hamburguesas al tratarse de carne picada, con la cual el consumidor es menos estricto en cuanto a su apariencia porque se relaciona con cortes de menor calidad (Troy y Kerry, 2010).

#### *4.2.4. Contenido de ácidos grasos n-3 de las hamburguesas de cordero*

La incorporación de los extractos, RWE (Tabla 3; Artículo II) y OE (ANEXO 5), en las hamburguesas afectó a su contenido en PUFA LCh (EPA+DHA). Las hamburguesas RWE200 tuvieron un contenido de EPA+DHA mayor que su control al final de la conservación (día 9), y las hamburguesas RWE50 y RWE100 tuvieron un contenido intermedio. En el caso de las hamburguesas OE, tanto las hamburguesas OE200 como OE400 tuvieron un contenido global de EPA+DHA mayor que en su control durante la conservación, mientras que las hamburguesas OE100 presentaron un contenido intermedio.

Según el Reglamento (UE) n° 116/2010 de la Comisión (2010), las hamburguesas formuladas con el aceite de pescado, tanto a las que se les adicionó el extracto de RWE o de OE como las hamburguesas control, podrían declararse como “alimento con un alto contenido en ácidos grasos omega-3” durante la primera mitad de la conservación, al presentar más de 80 mg EPA+DHA/100 g de producto. Al final del periodo de conservación, las hamburguesas RWE y las hamburguesas OE podrían ser declaradas como “alimento fuente de ácidos grasos omega-3”, al contener más de 40 mg EPA+DHA/100 g producto, sin embargo esto no ocurrió en las hamburguesas control,

cuyo contenido fue de alrededor de 20 mg EPA+DHA/100 g producto. Según los valores recomendados por EFSA, una cantidad de 250 mg EPA+DHA/día es la dosis adecuada para la población adulta. Teniendo en cuenta este dato, las hamburguesas OE aportarían entorno a un 15-20% de la ración diaria recomendada e incluso las hamburguesas RWE200 llegarían a aportar un 25% de esta ración, al final de la conservación (9 días).

##### *4.2.5. Evaluación sensorial de las hamburguesas de cordero*

En relación a la valoración organoléptica de las hamburguesas, la mayor parte de los atributos de olor y sabor estuvieron afectados por la incorporación de RWE y de OE, pero en diferente grado (Tabla 4; Artículo II; Tabla 4; Artículo III). El olor y sabor a cordero se vio afectado por la incorporación del OE, de forma que todas las hamburguesas OE recibieron una puntuación menor por parte de los panelistas con respecto a su control para ambos atributos. Sin embargo, en relación al RWE sólo en las hamburguesas RWE200 el olor a cordero obtuvo una puntuación inferior respecto a su control, sin notarse diferencias en el sabor a cordero entre las hamburguesas RWE y el control.

Los panelistas detectaron un olor y un sabor extraño en todas las hamburguesas OE (OE100, OE200 y OE400) en relación al control, mientras que sólo en las hamburguesas RWE200 se detectó un olor extraño, sin notarse ningún sabor extraño en ninguna hamburguesa RWE. Los miembros del panel sensorial relacionaron claramente el olor y el sabor extraño detectado en las hamburguesas OE con notas de aceituna. Este hecho probablemente enmascaró los atributos propios del sabor y olor a cordero, obteniendo de esta manera una puntuación más baja con respecto al control. En cuanto al RWE, su adición afectó al olor aportando notas que los panelistas identificaron con el vino tinto, aunque de una forma menos pronunciada que en el caso de las notas a oliva en el OE.

El olor a pescado se apreció de forma menos intensa en todas las hamburguesas OE en relación a su control, pero en las hamburguesas RWE no se observaron diferencia entre los distintos grupos para este atributo.

Por lo tanto, las principales diferencias entre los extractos empleados a las mismas dosis (100 y 200 mg GAE/kg carne), fueron el sabor aportado por el OE, lo que provocó una disminución en la detección del sabor a cordero, y el hecho de que en las hamburguesas

OE el olor a pescado fue detectado en menor grado por los panelistas. Por el contrario, el RWE aportó solo olor cuando se utilizó a la dosis más alta (hamburguesas RWE200) en las cuales se detectó menor olor a cordero, aunque no se redujo el olor a pescado con ninguna de las dos dosis.

Los compuestos fenólicos presentan connotaciones sensoriales que pueden tener gran efecto en el sabor de los alimentos en los que se encuentran. En este sentido, la presencia de compuestos fenólicos en el vino tinto tiene gran importancia en su valoración organoléptica. Las catequinas son las responsables del sabor ácido y amargo y, junto con las proantocianidinas, de la astringencia (Waterhouse, 2002), ambos compuestos presentes en el RWE. En relación con la oliva, el sabor amargo y picante (propio de los aceites virgen extra) se debe al contenido en compuestos fenólicos, concretamente a compuestos con estructura dihidroxifenol como es el caso del hidroxitirosol (Segura-Carretero, Menéndez-Menéndez y Fernández-Gutiérrez, 2010), el cual está presente de forma mayoritaria en el OE. No obstante, a pesar de los olores y sabores extraños identificados por el panel, la valoración global de las hamburguesas no se vio comprometida por la incorporación de ninguno de los extractos.



## **5. Conclusiones**

---



1. La incorporación de 900 mg de extracto de vino tinto/kg en la dieta de corderos enriquecida en ácidos grasos omega-3, no redujo los procesos oxidativos en la carne conservada en HiOx-MAP durante 12 días a 4°C; sin embargo, la incorporación de 300 mg de acetato de  $\alpha$ -tocoferilo/kg en la dieta previno estos fenómenos oxidativos.
2. La carne de los corderos que recibieron 900 mg de extracto de vino tinto/kg en la dieta presentó un mayor porcentaje de EPA y una relación n-6/n-3 más baja que el grupo control, por lo tanto mejoró el perfil en ácidos grasos desde el punto de vista nutritivo.
3. La incorporación de 900 mg de extracto de vino tinto/kg en la dieta de corderos enriquecida en ácidos grasos omega-3, no aportó ningún sabor pero no conservó la calidad organoléptica de la carne conservada en HiOx-MAP durante 6 días a 4°C, mientras que la incorporación de 300 mg de acetato de  $\alpha$ -tocoferilo/kg en la dieta disminuyó la detección del olor y sabor a rancio y a pescado.
4. La incorporación de extracto de vino tinto a tres niveles: 50, 100 y 200 mg GAE/kg en hamburguesas de cordero enriquecidas en ácidos grasos de cadena larga y conservadas en HiOx-MAP durante 9 días a 4°C, previno la oxidación lipídica y mantuvo el color más estable en comparación con el control, aunque el efecto más patente se observó con el empleo de la dosis más alta de extracto de vino tinto (200 mg GAE/kg carne). En cambio, la incorporación de 100 mg de  $\alpha$ -tocoferol/kg en las hamburguesas de cordero enriquecidas en ácidos grasos de cadena larga, no previno la oxidación lipídica durante la conservación.
5. Las hamburguesas de cordero formuladas con 200 mg GAE/kg de extracto de vino tinto, enriquecidas en ácidos grasos de cadena larga y conservadas en HiOx-MAP durante 9 días a 4°C, presentaron un contenido en ácidos grasos EPA y DHA mayor que el control al final de la conservación, aportando un 25% de la ración diaria recomendada de EPA+DHA.

6. La incorporación de extracto de vino tinto en hamburguesas de cordero a una dosis de 200 mg GAE/kg aportó un olor extraño a las hamburguesas, aunque la aceptación global no se vio afectada con respecto al control.
7. La incorporación de extracto de oliva a tres niveles: 100, 200 y 400 mg GAE/kg en hamburguesas de cordero enriquecidas en ácidos grasos de cadena larga y conservadas en HiOx-MAP durante 9 días a 4°C, previno la oxidación lipídica y proteica, y mantuvo el color más estable en comparación con el control, siendo el efecto más patente con el empleo de las dosis más altas de extracto de aceituna (200 y 400 mg GAE/kg carne).
8. Las hamburguesas de cordero formuladas con 100 y 200 mg GAE/kg carne de extracto de oliva, enriquecidas en ácidos grasos de cadena larga y conservadas en HiOx-MAP durante 9 días a 4°C, presentaron un contenido en ácidos grasos EPA y DHA mayor que el control durante la conservación.
9. La inclusión de extracto de aceituna en hamburguesas de cordero redujo la detección de olor a pescado durante la conservación, y el empleo de la dosis más alta (400 mg GAE/kg carne) disminuyó el sabor a pescado con respecto al control. La incorporación de extracto de oliva aportó un olor y sabor extraño a las hamburguesas, aunque la aceptación global no se vio afectada.

## **6. Referencias bibliográficas**

---



- Ahn, J., Grün, I.U. y Fernando, L.N. (2002). Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *Journal of Food Science*, 67, 1364-1369.
- Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, J. y Decker, E.A. (2009). Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2969-2976.
- Álvarez, I., De la Fuente, J., Cañeque, V., Lauzurica, S., Pérez, C. y Díaz, M.T. (2008). Changes in the fatty acid composition of M. longissimus dorsi of lamb during storage in a high-oxygen modified atmosphere at different levels of dietary vitamin E supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Álvarez, I., De la Fuente, J., Díaz, M.T., Lauzurica, S., Pérez, C. y Cañeque, V. (2008). Estimation of  $\alpha$ -tocopherol concentration necessary to optimise lamb meat quality stability during storage in high-oxygen modified atmosphere using broken-line regression analysis. *Animal*, 2, 1405-1411.
- Andrés, S., Tejido, M.L., Bodas, R., Morán, L., Prieto, N., Blanco, C. y Giráldez, F.J. (2013). Quercetin dietary supplementation of fattening lambs at 0.2% rate reduces discolouration and microbial growth in meat during refrigerated storage. *Meat Science*, 93, 207-212.
- Andrés, A.I., Petró, M.J., Adámez, J.D., López, M. y Timón, M.L. (2017). Food by-products as potential antioxidant and microbial additives in chill stored raw lamb patties. *Meat Science*, 129, 62-70.
- Aouadi, D., Luciano, G., Vasta, V., Nasri, S., Brogna, D.M.R., Abidi, S., Priolo, A. y Salem, H.B. (2014). The antioxidant status and oxidative stability of muscle from lambs receiving oral administration of *Artemisa herba alba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Meat Science*, 97, 237-243.
- Apeleo, E.C. (2016). Antioxidants naturales en la dieta de cordero para preservar las características físicas, químicas y sensoriales de su carne enriquecida en ácidos grasos omega 3. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Producción Animal. Madrid.
- Bas, P., Berthelot, V., Pottier, E. y Normand, J. (2007). Effect of level of linseed on

fatty acid composition of muscles and adipose tissues of lambs with emphasis on trans fatty acids. *Meat Science*, 77, 678-688.

Bernardi, D.M., Bertol, T.M., Pflanzner, S.B., Sgarbieri, V.C. y Pollonio, M.A.R. (2016).  $\omega$ -3 in meat products: benefits and effects on lipid oxidative stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 2620-2634.

Bilek, A.E. y Turhan, S. (2009). Enhancement of the nutritional status of beef patties by adding flaxseed flour. *Meat Science*, 82, 472-477.

Bodas, R., Prieto, N., Jordán, M.J., López-Campos, O., Giráldez, F.J., Morán, L. y Andrés, S. (2012). The liver antioxidant status of fattening lambs is improved by naringin dietary supplementation at 0,15 % rates but not meat quality. *Animal*, 6, 863-870.

Bolger, Z., Brunton, N.P., Lyng, J.G. y Monahan, F.J. (2016). Quality attributes and retention of vitamin E in reduced salt chicken sausages fortified with vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 3948-3959.

Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, I., Fletouris, D. y Botsoglou, N. (2014). Effect of olive leaf (*Olea europea* L.) extracts on protein and lipid oxidation of long-term frozen *n*-3 fatty acids-enriched pork patties. *Meat Science*, 98, 150-157.

Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, I., Fletouris, D. y Papageorgiou, G. (2014). Effect of olive leaf (*Olea europea* L.) extracts on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties enriched with *n*-3 fatty acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 227-234.

Buccioni, A., Decandia, M., Minieri, S., Molle, G. y Cabiddu, A. (2012). Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology*, 174, 1-25.

Campo, M.M., Nute, G.R., Hughes, S.I., Enser, M., Wood, J.D. y Richardson, R.I. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, 72, 303-311.

Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P. y Ferreira, I.C.F.R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives.

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13, 377-399.

Carpenter, C.E., Cornforth, D.P. y Whittier, D. (2001). Consumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction. *Meat Science*, 57, 359-363.

Chang, J.H.P., Lunt, D.K. y Smith, S.B. (1992). Fatty-acid composition and fatty-acid elongase and stearyl-Coa desaturase activities in tissues of steers fed high oleate sunflower seed. *Journal of Nutrition*, 122, 2074-2080.

Cieslak, A., Stanisz, M., Wojtowski, J., Pers-Kamczyc, E., Szczechowiak, J., El-Sherbiny, M. y Szumacher-Straber, M. (2013). *Camelina sativa* affects the fatty acid contents in *M. longissimus* muscle of lambs. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 1258-1265.

Cofrades, S., Salcedo Sandoval, L., Delgado-Pando, G., López-López, I., Ruiz-Capillas, C. y Jiménez-Colmenero, F. (2011). Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with *n*-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 129, 429-436.

Coppen, P.P. (1983). Use of antioxidants. En *Rancidity in Foods* (pág. 67-87). Allen, J.C. y Hamilton, R.J., Eds. Applied Science Publishing Company, Londres.

D'Arvichio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. y Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43, 248-361.

Department of Health (1994). Nutritional aspects of cardiovascular disease: Report of the Cardiovascular Review Group, Committee on Medical Aspects of Food Policy, vol. 46. Eds: Great Britain, Department of Health. H.M. Stationery Office Publisher, London. pp. 186.

Devcich, D.A., Pedersen, I.K., & Petrie, K.J. (2007). You eat what you are: Modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite*, 48, 333-337.

Díaz, M.T., Álvarez, I., De la Fuente, J., Sañudo, C., Campo, M.M., Oliver, M.A., Font i Furnols, M., Montossi, F., San Julián, R., Nute, G.R. y Cañeque, V. (2005). Fatty acid composition of meat from typical lamb production systems of Spain, United Kingdom,

Germany and Uruguay. *Meat Science*, 71, 256-263.

Díaz, M.T., Cañeque, V., Sánchez, C.I., Lauzurica, S., Pérez, C., Fernández, C., Álvarez, I. y De la Fuente, J. (2011). Nutritional and sensory aspects of light lamb meat enriched in *n*-3 fatty acids during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 124, 147-155.

Díaz, M.T., Pérez, C., Sánchez, C.I., Lauzurica, S., Cañeque, V., González, C. y De la Fuente, J. (2017). Feeding microalgae increases omega 3 fatty acids of fat deposits and muscle in light lambs. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, 115-123.

Díaz, M.T., Rivas-Cañedo, A., De la Fuente, J., Pérez, C. y Lauzurica, S. (2013). Meat and meat products enriched with *n*-3 fatty acids. En: *Handbook of Food Fortification and Health. From Concepts to Public Health Application (Vol. 2)* (Ed. Preedy, V.R., Srirajaskanthan, R. y Patel, V.B.), pp. 55-69. Springer, New York, USA.

Díaz, M.T., Sánchez, M., Martínez, B., Vieira, C. y García, M.D. (2005). Valor nutritivo de la carne. Determinación del contenido energético. En: *Estandarización de la metodologías par evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los rumiantes* (pp. 274-281). Eds. Cañeque V. y Sañudo, C. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Ministerio de Educación y Ciencia. Madrid, España

Díaz, M.T., Velasco, S., Cañeque, V., Lauzurica, S., Ruiz de Huidobro, F., Pérez, C., González, J. y Manzanares, C. (2002). Use of concentrate or pasture for fattening lambs and its effect on carcass and meat quality. *Small Ruminant Research*, 43, 257-268.

EFSA 2010a. Scientific opinion of dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8, 1-107. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1461>

EFSA 2011. EFSA Panel on Food additives and Nutrient Source added to Food (ANS). Scientific opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA (E 320) as a food additive. *EFSA Journal*, 9, 2392. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.2392/epdf>

EFSA 2012. EFSA Panel on Food additives and Nutrient Source added to Food (ANS). Scientific opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene – BHT (E 321) as a

food additive. EFSA Journal, 10, 2588. Disponible en:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2588/epdf>

EFSA 2014. EFSA Panel on Food additives and Nutrient Source added to Food (ANS). Scientific opinion on the re-evaluation of propyl gallate (E 310) as a food additive. EFSA Journal, 12, 3642. Disponible en:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2014.3642/epdf>

EFSA 2016. EFSA Panel on Food additives and Nutrient Source added to Food (ANS). Statement on the refined exposure assessment of tertiary-butyl hydroquinone (E 319). EFSA Journal, 14, 4363. Disponible en:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2016.4363/epdf>

Elmore, J.S., Mottram, D.S., Enser, M. y Wood, J.D. (2000). The effects of diet and breed on the volatile compounds of cooked lamb. *Meat Science*, 55, 149-159.

Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat system: a review. *Meat Science*, 89, 259-279.

Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R. y Heinonen, M. (2008). Oxidation of skeletal muscle myofibrillar proteins in oil-in-water emulsions: interaction with lipids and effect of selected phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10933-10940.

Falowo, A.B., Fayemi, P.O. y Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 64, 171-181.

Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R. y Suman, S.P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, 86, 86-94.

Fontana, A.R., Antonioli, A. y Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8987-9003.

Font i Furnols, M., Realini, C.E., Guerrero, L., Oliver, M.A., Sañudo, C., Campo, M.M., Nute, G.R., Cañeque, V., Álvarez, I., San Julián, R., Luzardo, S., Brito, G. y Montossi, F. (2009). Acceptability of lamb fed on pasture, concentrate or combinations

of both systems by European consumers. *Meat Science*, 81, 196-202.

Frankel, E.N. (2005). *Lipid Oxidation* (2ª Edición). The Oily Press, Bridgwater, England

French, P.C., Stanton, C., Lawless, F., O’Riordan, G., Monahan, F.J., Caffrey, P.J. y Monoley, A.P. (2000). Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage or concentrate based diets. *Journal of Animal Science*, 78, 2849-2855.

Ganesan, B., Brothersen, C. y McMahon, D.J. (2014). Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 98-114.

Gatellier, Ph., Kondjoyan, A., Portanguen, S. y Santé-Lhoutellier, V. (2010). Effect of cooking on protein oxidation in *n*-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implications on nutritional quality. *Meat Science*, 85, 645-650.

Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K.M., Gilani, A. y Saari, N. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europea* L.) – A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3291-3340.

Glaser, C., Heinrich, J. y Koletzko, B. (2010). Role of *FADS1* and *FADS2* polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metabolism Clinical and Experimental*, 59, 993-999.

Gómez, I., Beriain, M.J., Mendizabal, J.A., Realini, C. y Purroy A. (2016). Shelf life of ground beef enriched with omega-3 and/or conjugated linoleic acid and use of grape seed extract to inhibit lipid oxidation. *Food Science & Nutrition*, 4, 67-79.

González-Calvo, L., Ripoll, G., Molino, F., Calvo, J.H. y Joy, M. (2015). The relationship between muscle  $\alpha$ -tocopherol concentration and meat oxidation in light lambs fed vitamin E supplements prior to slaughter. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 103-110.

Gravador, R.S., Jongberg, S., Andersen, L., Luciano, G., Priolo, A. y Lund, M.N. (2014). Dietary citrus pulp improves protein stability in lamb meat stored under aerobic conditions. *Meat Science*, 97, 231-236.

- Greene, B.E., Hsin, I. y Zipser, M.W. (1971). Retardation of oxidative color changes in raw ground beef, 36, 940-942.
- Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Couirard, P.Y., Nurmanela, K.V.V. y Bauman, D.E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *Journal of Nutrition*, 130, 2285-2291.
- Guardiola, F., Codony, R., Addis, P.B., Rafecas, M. y Botella, J. (1996). Biological effects of oxysterols: current status. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 193-211.
- Guerra-Rivas, C., Lavín, P., Gallardo, B., Mantecón, A.P., Vieira, C. y Manso, T. (2013). Grape pomace and grape seed extract in lambs diet: Meat fatty acid profile and antioxidant activity. En: *Book of abstracts of the 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP, 2013)* (pp. 379). Holland: Wageningen Academic Publishers.
- Guerra-Rivas, C., Vieira, C., Rubio, B., Martínez, B., Gallardo, B., Mantecón, A.R., Lavín, P. y Manso, T. (2016). Effects of grape pomace in growing lamb diets compared with vitamin E and grape seed extract on meat shelf life. *Meat Science*, 116, 221-229.
- Gutiérrez-Grijalva, E.P., Ambriz-Pérez, D.L., Leyva-López, N., Castillo-López, R.I. y Heredia, J.B. (2016). Review: dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66, 87-100.
- Ha, Y.L.J., Storkson, M. y Pariza, W. (1990). Inhibition of benzo(a)-pyreneinduced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linolenic acid. *Cancer Research*, 50, 1097-1101.
- Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposia*, 61, 73-101.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Harfoot, C.G. y Hazlewood, G.P. (1988). Lipid metabolism in the rumen. En: *The Rumen Microbial Ecosystem* (ed. P.N. Hobson), pp. 382-426. Elsevier, New York, USA.
- Heck, R.T., Vendruscolo, R.G., Etchepare, M.A., Cichoski, A.J., de Menezes, C.R.,

- Barin, J.S., Lorenzo, J.M., Wagner, R. y Campagnol, P.C.B. (2017). Is it possible to produce a low-fat burger with a healthy n-6/n-3 PUFA ratio without affecting the technological and sensory properties?. *Meat Science*, 130, 16-25.
- Inserra, L., Priolo, A., Biondi, L., Lanza, M., Bognanno, M., Gravador, R. y Luciano, G. (2014). Dietary citrus pulp reduces lipid oxidation in lamb meat. *Meat Science*, 96, 1489-1493.
- Jafari, S., Meng, G.Y., Rajjon, M.A., Jahromi, M.F. y Ebrihimi, M. (2016). Manipulation of rumen microbial fermentation by polyphenol rich solvent fractions from papaya leaf to reduce green-house gas methane and biohydrogenation of C18 PUFA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 4522-4530.
- Jerónimo, E., Alfaia, C.M.M., Alves, S.P., Dentinho, M.T.P., Prates, J.A.M., Vasta, V., Santos-Silva, J. y Bessa, R.J.B. (2012). Effect of dietary grape seed extract and *Cistus ladanifer* L. in combination with vegetable oil supplementation on lamb meat quality. *Meat Science*, 92, 841-847.
- Jerónimo, E., Alves, S.P., Dentinho, M.T.P., Martins, S.V., Prates, J.A.M., Vasta, V., Santos-Silva, J. y Bessa, R.J.B. (2010). Effect of grape seed extract, *Cistus ladanifer* L., and vegetable oil supplementation on fatty acid composition of abomasal digesta and intramuscular fat of lambs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10710-10721.
- Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention therapy. *Free Radical Biology & Medicine*, 72, 76-90.
- Jiang, J. y Xiong, Y.L. (2016). Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Science*, 120, 107-117.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 567-578.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J. y Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, 56, 5-13.

- Jongberg, S., Gislason, N.E., Lund, M.N., Skibsted, L.H. y Waterhouse, A.L. (2011). Thiol-quinone adduct formation in myofibrillar proteins detected by LC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6900-6905.
- Kanner, J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*, 36, 169-189.
- Kanner, J. (2007). Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 1094-1101.
- Karre, L., Lopez, K. y Getty, K.J.K. (2013). Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, 94, 220-227.
- Kim, Y.H., Huff-Lonergan, E., Sebranek, J.G. y Lonergan, S.M. (2010). High-oxygen modified atmosphere packaging system induces lipid and myoglobin oxidation and protein polymerization. *Meat Science*, 85, 759-767.
- Kitessa, S.M., Gulati, S.K., Ashes, J.R., Scott, T.W. y Fleck, E. (2001). Effect of feeding tuna oil supplement protected against hydrogenation in the rumen on growth and *n*-3 fatty acid content of lamb fat and muscle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52, 433-437.
- Koyama, K., Kamigakiuchi, H., Iwashita, K., Mochioka, R. y Goto-Yamamoto, N. (2017). Polyphenolic diversity and characterization in the re-purple berries of East Asian wild *Vitis* species. *Phytochemistry*, 134, 78-86.
- Kumar, Y., Yadav, D.N., Ahmad, T. y Narsaiah (2015). Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 796-812.
- Kumar, S. y Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-16.
- Laguerre, M., Lecomte, J. y Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
- Lauzurica, S., de la Fuente, J., Díaz, M.T., Álvarez, I., Pérez, C. y Cañeque, V. (2005). Effect of dietary supplementation of vitamin E on characteristics of lamb meat packed

under modified atmosphere. *Meat Science*, 70, 639-646.

Lee, S., Decker, E.A., Faustman, C. y Mancini, R.A. (2005). The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in n-3 oil fortified ground beef patties. *Meat Science*, 70, 683-689.

Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N. y Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *Journal of Physical Chemistry A*, 108, 4916-4922.

Liu, Q., Lanari, M.C. y Schaefer, D.M. (1995). A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *Journal of Animal Science*, 73, 3131-3140.

Lock, A.L., Corl, B.A., Barbano, D.M., Bauman, D.E. e Ip, C. (2004). The anticarcinogenic effect of *trans*-11 18:1 is dependent on its conversion to *cis*-9,*trans*-11 CLA by delta9-desaturase in rats. *Journal of Nutrition*, 134, 2698-2704.

López-Andrés, P., Luciano, G., Vasta, V., Gibson, T.M., Biondi, L., Priolo, A. y Mueller-Harvey, I. (2013). Dietary quebracho tannins are not absorbed, but increase the antioxidant capacity of liver and plasma in sheep. *British Journal of Nutrition*, 110, 632-639.

Luciano, G., Monahan, F.J., Vasta, V., Biondi, L., Lanza, M. y Priolo (2009). Dietary tannins improve lamb meat colour stability. *Meat Science*, 81, 120-125.

Luciano, G., Vasta, V., Monahan, F.J., López-Andrés, P., Biondi, L., Lanza, M. y Priolo, A. (2011). Antioxidant status, color stability and myoglobin resistance to oxidation of *longissimus dorsi* muscle from lambs fed a tannin-containing diet. *Food Chemistry*, 124, 1036-1042.

Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P. y Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, 83-95.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.

Mancini, R.A. y Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71,

100-121.

MacDougall, D.B. (1982). Changes in the colour and opacity of meat. *Food Chemistry*, 9, 75-88.

Maraschiello, C., García-Regueiro, J.A. y Sárraga, C. (1997). La oxidación del colesterol y su influencia en la calidad de la carne y productos derivados. *Eurocarne*, 52, 67-74.

McMillin, K.W. (2008). Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, 80, 43-65.

Meale, S.J., Chaves, A.V., He, M.L. y McAllister, T.A. (2014). Dose-response of supplementation marine algae (*Schizochytrium* spp.) on production performance, fatty acid profiles, and wool parameters of growing lambs. *Journal of Animal Science*, 92, 2202-2213.

Moilanen, J., Karonen, M., Tähtinen, P., Jacquet, R., Quideau, S. y Salminen, J.P. (2016). Biological activity of ellagitannins: effects as anti-oxidants, pro-oxidants and metal chelators. *Phytochemistry*, 125, 65-72.

Moloney, A.P., Kennedy, C., Noci, F., Monahan, F.J. y Kerry, J.P. (2012). Lipid and colour stability of M. Longissimus muscle from lambs fed camelina of linseed as oil or seed. *Meat Science*, 92, 1-7.

Moñino, I., Martínez, C., Sotomayor, J.A., Lafuente, A. y Jordán, J. (2008). Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes' diet supplement with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3363-3367.

Morales, J.C. y Lucas, R. (2010). Structure-activity relationship of phenolic antioxidants and olive components. In V.R. Preedy, & R.R. Watson (Eds.), *Olive and Olives Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 905-914). Amsterdam [etc]: Elsevier: Academic Press Inc.

Morán, L., Andrés, S., Bodas, R., Prieto, N. y Giráldez, F.J. (2012). Meat texture and antioxidant status are improved when carnosic acid is included in the diet of fattening lambs. *Meat Science*, 91, 430-434.

- Morán, L., Giráldez, F.J., Panseri, S., Aldai, N., Jordán, M.J., Chiesa, L.M. y Andrés, S. (2013). Effect of dietary carnosic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs. *Food Chemistry*, 138, 2407-2414.
- Morán, L., Rodríguez-Calleja, J.M., Bodas, R., Prieto, N., Giráldez, F.J. y Andrés, S. (2012). Carnosic acid dietary supplementation at 0.12% rates slows down meat discoloration in *gluteus medius* of fattening lambs. *Meat Science*, 90, 789-795.
- Morrissey, P.A., Sheehy, P.J.A., Galvin, K., Kerry, J.P. y Buckley, D.J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, S73-S86.
- Morzel, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renerre, M. y Laville, E. (2006). Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Science*, 73, 536-543.
- Muguerza, E., Ansorena, D. y Astiasarán, I. (2004). Functional dry fermented sausages manufactured with high levels of *n*-3 fatty acids: nutritional benefits and evaluation of oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1061-1068.
- Munekata, P.E.S., Domínguez, R., Franco, D., Bermúdez, R., Trindade, M.A. y Lorenzo, J.M. (2017). Effect of natural antioxidants in Spanish salchichón elaborated with encapsulated *n*-3 long chain fatty acids in konjac glucomannan matrix. *Meat Science*, 124, 54-60.
- Muriel, E., Ruiz, J., Ventanas, J. y Antequera, T. (2002). Free-range rearing increases (*n*-3) polyunsaturated fatty acids of neutral and polar lipids in swine muscles. *Food Chemistry*, 78, 219-225
- Mustacich, D.J., Bruno, R.S. y Traber, M.G. (2007). Vitamin E. *Vitamins and Hormones*, 76, 1-21.
- Napolitano, A., De Lucia, M., Panzella, L. y d'Ischia, M. (2010). The chemistry of tyrosol and hydroxytyrosol: implications for oxidative stress. In V.R. Preedy, & R.R. Watson (Eds.), *Olive and Olives Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 1225-1232). Amsterdam [etc]: Elsevier: Academic Press Inc.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S. y Garrido, D. (2010). Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb

meat quality. *Meat Science*, 84, 23-29.

Nieto, G., Martínez, L., Castillo, J. y Ros, G. (2017). Hydroxytyrosol extracts, olive oil and walnuts as functional components in chicken sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI 10.1002/jsfa.8240

Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 503-515.

Niki, E. (2014). Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Free Radical Biology & Medicine*, 66, 3-12.

Niki, E. y Noguchi, N. (2004). Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Accounts of Chemical Research*, 37, 45-51.

Niki, E., Omata, Y., Fukuhara, A., Saito, Y. y Yoshida, Y. (2008). Assessment of radical scavenging capacity and lipid peroxidation inhibiting capacity of antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8255-8260.

Niki, E. y Traber, M.G. (2012). A history of vitamin E. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 61, 207-212.

Nkhili, E. y Brat, P. (2011). Reexamination of the ORAC assay: effect of metal ions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 1451-1458.

Noci, F., Monahan, F.J., French, P. y Moloney, A.P. (2005). The fatty acid composition of muscle fat and subcutaneous adipose tissue of pasture-fed heifers: Influence of the duration of grazing. *Journal of Animal Science*, 83, 1167-78.

Nunes, M.A., Pimentel, F.B., Costa, A.S.G., Alves, R.C. y Oliveira, M.B.P.P. (2016). Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 35, 139-148.

Nute, G.R., Richardson, R.I., Wood, J.D., Hughes, S.I., Wilkinson, R.G., Cooper, S.L. y Sinclair, L.A. (2007). Effect of dietary oil source on the flavour and the colour and lipid stability of lamb meat. *Meat Science*, 77, 547-555.

O'Grady, M.N., Monahan, F.J., Burke, R.M. y Allen, P. (2000). The effect of oxygen level and exogenous  $\alpha$ -tocopherol on the oxidative stability of minced beef in modified

- atmosphere packs. *Meat Science*, 55, 39-45.
- Ortuño, J., Serrano, R., Jordán, M.J. y Bañón, S. (2014). Shelf life of meat from lambs given essential oil-free rosemary extract containing carnosic acid plus carnosol at 200 or 400 mg kg<sup>-1</sup>. *Meat Science*, 96, 1452-1459.
- Ouni, Y., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. y Zarrouk, M. (2011). Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Food Chemistry*, 127, 1263-1267.
- Park, D., Xiong, Y.L., Alderton, A.L. y Ooizumi, T. (2006). Biochemical changes in myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4445-4451.
- Pérez, B. (2010). Suplementación de raciones para cebo intensivo de terneros con aceites vegetales: rendimientos productivos, calidad de la canal, de la grasa y de la carne. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Ponnampalam, E.N., Butler, K.L., McDonagh, M.B., Jacobs, J.L. y Hopkins, D.L. (2012). Relationship between muscle antioxidant status, forms of iron, polyunsaturated fatty acids and functionality (retail colour) of meat in lambs. *Meat Science*, 90, 297-303.
- Ponnampalam, E.N., Sinclair, A.J., Egan, A.R., Blakeley, S.J., Li, D. y Leury, B.J. (2001). Effect of dietary modifications of muscle long-chain n-3 fatty acid on plasma insulin and lipid metabolites, carcass traits, and fat deposition in lambs. *Journal of Animal Science*, 79, 895-903.
- Ponnampalam, E.N., Sinclair, A.J., Hosking, B.J. y Egan, A.R. (2002). Effects of dietary lipid type on muscle fatty acid composition, carcass leanness, and meat toughness in lambs. *Journal of Animal Science*, 80, 628-636.
- Ponte, P.I.P., Prates, J.A.M., Crespo, K.P., Crespo, D.G., Mourao, J.L., Alves, S.P., Bessa, R.J.B., Chaveiro-Soares, M.A., Gama, L.T., Ferreira, L.M.A. y Fontes, C.M.G.A. (2008). Restricting the intake of a cereal-based feed in free-range-pastured poultry: Effects on performance and meat quality. *Poultry Science*, 87, 2032-2042.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E. y Mills, K.A. (1995). Mechanisms of free radical oxidation

of unsaturated lipids. *Lipids*, 30, 277-290.

Raes, K., De Smet, S., Balcaen, A., Claeys, E. y Demeyer, D. (2003). Effect of diets rich in N-3 polyunsaturated fatty acids on muscle lipids and fatty acids in Belgian Blue double-muscled Young bulls. *Reproduction Nutrition Development*, 43, 331-345.

Raes, K., De Smet, S. y Demeyer, D. (2004). Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 113, 199-221.

Rainer, L. y Heiss, C.J. (2004). Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition. *Journal of the American Dietetic Association*, 104, 963-968.

Reglamento de la Comisión de la Unión Europea (2010). Reglamento (UE) nº 116/2010 de la Comisión de 9 de febrero de 2010

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. y Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. y Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.

Ripoll, G., González-Calvo, Molino, F., Calvo, J.H. y Joy, M. (2013). Effects of finishing period length with vitamin E supplementation and alfalfa grazing on carcass color and the evolution of meat color and the lipid oxidation of light lambs. *Meat Science*, 93, 906-913.

Rodrigo, R., Miranda, A. y Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412, 410-424.

Ruiz, J.C.R., Vázquez, E.D.O., y Campos, M.R.S. (2017). Encapsulation of vegetable oils as source of omega-3 fatty acids for enriched functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 1423-1434.

Rule, D.C. y Beitz, D.C. (1986). Fatty-acids of adipose-tissue, plasma, muscle and duodenal ingesta of steers fed extruded soybeans. *Journal of American Oil Chemists Society*, 63, 1429-1436.

- Rymer, C., Gibbs, R.A. y Given, D.I. (2010). Comparison of algal and fish sources on the oxidative stability of poultry meat and its enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Science*, 89, 150-159.
- Scalbert, A. y Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130, 2073S-2085S.
- Schaefer, F.Q., Qian, Y.S. y Buettner, G.R. (2000). Iron and free radical oxidations in cell membranes. *Cellular and Molecular Biology*, 46, 657-662.
- Schroepfer, G.J.Jr. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological Reviews*, 80, 361-554.
- Scollan, N.D., Choi, N.J., Kurk, E., Fisher, A.V., Enser, M. y Wood, J.D. (2001). Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *British Journal of Nutrition*, 85, 115-124.
- Scollan, N.D., Hocquette, J.F., Nuernberg, K., Dannenberger, D., Richardson, R.I. y Moloney, A. (2006). Innovations in beef production systems that nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*, 74, 17-33.
- Segura-Carretero, A., Menéndez-Menéndez, J. y Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Polyphenols in olive oil: the importance of phenolic compounds in the chemical composition of olive oil. In V.R. Preedy, & R.R. Watson (Eds.), *Olive and Olives Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 167-175). Amsterdam [etc]: Elsevier: Academic Press Inc.
- Shah, M.A., Bosco, S.J.D., Mir, S.A. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 98, 21-33.
- Shahidi, F. (2010). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44, 158-163.
- Shahidi, F. y de Camargo, A.C. (2016). Tocopherols and tocotrienols in common and emerging dietary sources: occurrence, applications, and health benefits. *International Journal of Molecular Science*, 17, 1745.
- Shahidi, F. y Naczki M. (2004a). Biosynthesis, classification, and nomenclature of phenolics in food and nutraceutical. En *Phenolics in Food and Nutraceuticals* (pág. 1-16). Boca Raton, FL: CRC Press.

- Shahidi, F. y Naczki M. (2004b). Antioxidant properties of food phenolics. En *Phenolics in Food and Nutraceuticals* (pág. 398-438). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Shahidi, F. y Wanasundara, P.K.J. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- Shahidi, F. y Zhong, Y. (2007). Measurement of antioxidant activity in food and biological systems. En *Antioxidant Measurement and Applications* (pág. 36-66). ACS symposium series 956. Washington, DC: American Chemical Society.
- Shahidi, F. y Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39, 4067-4079.
- Shahidi, F. y Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
- Shingfield, K., Bonnet, M. y Scollan, N. (2013). Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal*, 7, 132-162.
- Silva, M.M., Santos, M.R., Caroço, G., Rocha, R., Justino, G. y Mira, L. (2002). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radical Research*, 36, 1219-1227.
- Simopoulos, A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 674-688.
- Simopoulos, A.P. (2011). Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Molecular Neurobiology*, 44, 203-215.
- Soladoye, O.P., Juárez, M.L., Aalhus, J.L., Shand, P. y Estévez, M. (2015). Protein oxidation in processed meat: mechanisms and potential implications on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 106-122.
- Stivala, L.A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L., Pagnoni, U.M., Albini, A., Prosperi, E. y Vannini, V. (2001). Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 22586-22594.
- Suman, S.P. y Joseph, P. (2013). Myoglobin chemistry and meat color. *Annual of Food*

Science and Technology, 4, 79-99.

Traber, M.G. y Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 4-15.

Troy, D.J. y Kerry, J.P. (2010). Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Science*, 86, 214-226.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.

Valencia, I., Ansorena, D. y Astiasarán, I. (2006). Nutritional and sensory properties of dry fermented sausages enriched with *n*-3 PUFAs. *Meat Science*, 72, 727-733.

Valencia, I., Ansorena, D. y Astiasarán, I. (2007). Development of dry fermented sausages rich in docosahexaenoic acid with oil from the microalgae *Schizochytrium* sp: Influence on nutritional properties, sensorial quality and oxidation stability. *Food Chemistry*, 104, 1087-1096.

Vasta, V., Aouadi, D., Brogna, D.M.R., Scerra, M., Luciano, G., Priolo, A. y Salem, H.B. (2013). Effect of the dietary supplementation of essential oils from rosemary and artemisia on muscle fatty acids and volatile compound profile in Barbarine lambs. *Meat Science*, 95, 235-241.

Vasta, V., Mele, M., Serra, A., Scerra, M., Luciano, G., Lanza, M. y Priolo, A. (2009). Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins. *Journal of Animal Science*, 87, 2674-2684.

Vissa, A. y Cornforth, D. (2006). Comparison of milk mineral, sodium tripolyphosphate, and vitamin E as antioxidants in ground beef in 80% oxygen modified atmosphere packaging. *Journal of Food Science*, 71, C65-C68.

Waterhouse, A.L. (2002). Wine phenolics. *Annals New York Academy of Sciences*, 957, 21-36.

Williams, C. (2000). Dietary fatty acids and human health. *Annals de Zootechnie*, 49, 165-180.

Williams, C.M. y Burdge, G. (2006). Review: Long-chain *n*-3 PUFA: plant v. marine

sources. Proceedings of the Nutrition Society, 65, 42-45.

Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I. y Whittington, F.M. (2008). Fat deposition, fatty acids composition and meat quality: A review. Meat Science, 78, 343-358.

Xiong, Y.L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle food quality. En *Antioxidants in Muscle Foods* (pág. 85-111). Decker, A., Faustman, C. y López-Bote, C. (Eds.). Toronto: Wiley-Interscience.

Zhu, L., Zhang, Y. y Lu, J. (2012). Phenolics contents and composition in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and origination. International Journal of Molecular Science, 13, 3492-3510.



**ANEXOS**

---



## **ANEXO 1**

Especificaciones del extracto de vino tinto según las indicaciones del fabricante



## 1 - DESCRIPTION

A fine or granulated powder obtained from selected red wine produced in Languedoc-Roussillon regions (France).

**PROVINOLS™** is a natural and efficient source of the antioxidant polyphenols contained in red wine and which properties are known as “*The French Paradox*”.

Aspect	Fine or granulated powder
Colour	Dark red to purple
Odour	Tannic
Taste	Astringent

## 2 - ANALYSIS

### 2.1 - Active ingredients

Total polyphenols 95% min.

*measured by absorbance at 280 nm and expressed as catechin equivalent*

Identification of polyphenols (among the 200 existing red wine polyphenols)

***These results are given just for information and do not consist in product specifications***

Family	Polyphenols	Value (%)
Oligomers	Proanthocyanidole B1	1.4
	Proanthocyanidole B2	0.87
	Proanthocyanidole B3	0.31
	Proanthocyanidole B4	0.91
Monomers	Catechin	1.51
	Epicatechin	1.76
	B2 3-O gallate	0.54
	Epicatechin 3-O gallate	0.10
Phenolic acids	Chlorogenic acid	0.54
	p-coumaric acid	0.18
	Gallic acid	0.08
Stilbens	Resveratrol	0.17

***References of analytical methods : HPLC – NUTRINOV (Rennes, France)***



## 2.2 - Nutritional facts

Characteristics	Results
Protein (N x 6.25)	8.81 %
Fat	0.17 %
Carbohydrate	15.14 %
Ashes	4.71 %

*References of analytical methods : standard methods*

Recommended daily dosage (red wine polyphenols) 100 to 300 mg/day

## 2.3 - Microbiological specifications

Characteristics	Results
Total plate count	1000 CFU/g
Coliforms	< 100 CFU/g
E. Coli	absence/g
Pathogenic Staphylococci	absence/g
Salmonella	absence/25g
Pseudomona aeruginosa	absence/g
Yeast-Mould	< 100 CFU/g

## 3 - PHYSICAL DATA

Loss on drying	< 5 %
Solubility (water, 20°C, pH 3-4)	> 1 %
Solubility (ethanol 15 %)	> 4 %



## 4 - TOXICOLOGICAL AND REGULATORY DATA

### 4.1 - Toxicology

Acute dermal test/rabbit : non irritant  
Acute toxicity : LD 50 orally/rat : > 2000 mg/kg

### 4.2 - Regulatory data

Extract of total polyphenols compounds of red wine extract, **PROVINOLS™** is a food derivative product. It is not an additive and could be use freely in nutraceutical and health food products.

## 5 - PACKAGING AND STORAGE

Packaging	25kg double wall polyethylene-lined cartons
Storage	Store in a cool, dry and dark place
Shelflife	3 years
Transport – labelling	Product not under the transport regulations

## 6 - USES

**PROVINOLS™** is used as a nutritional ingredient for its health benefits in beverages (soft drinks, alcoholics drinks, fruit juices), diary products and dietary supplements. It is also used in nutraceutical supplements in form of capsules, tablets or sachets.

*Product manufactured by Société Française de Distilleries (FRANCE)*



### **Nota**

The analytical specifications warranted are only those mentioned on the certificate of analysis supplied with each delivery of the product.

Except as set forth above, SEPPIC\* makes no warranties, whether express, implied or statutory, as to the product which is the subject of this document . Without limiting the generality of the foregoing, SEPPIC\* makes no warranty of merchantability of the product or of the fitness of the product for any particular purpose. Buyer assumes all risk and liability resulting from the use or sale of the product, whether singly or in combination with other goods. The information set forth herein is furnished free of charge and is based on technical data that SEPPIC\* believes to be reliable. It is intended for use by persons having technical skill and at their own discretion and risk. Since conditions of use are outside SEPPIC\*'s control, SEPPIC\* makes no warranties, express or implied, and assumes no liability in connection with any use of this information. Nothing herein is to be taken as a license to operate under or a recommendation to infringe any patents.

\* SEPPIC being:

and, depending on the country :

#### **SEPPIC S.A.**

75, quai d'Orsay  
75321 Paris cedex 07  
FRANCE  
Tel. : +33 (0) 1 40 62 55 55  
Fax : +33 (0) 1 40 62 52 53

#### **SEPPIC UK Ltd**

50 Salisbury Road  
PO Box 338 - Hounslow  
TW4 6SH - ENGLAND  
Tel. : +44 208 577 8800  
Fax : +44 208 570 2106

#### **SEPPIC ITALIA Srl**

Via Quarenghi 27  
20151 Milano  
ITALY  
Tel. : +39 02 38009110  
Fax : +39 02 38009140

#### **SEPPIC Inc.**

30, Two Bridges Road, suite 210  
Fairfield, New Jersey 07004-1530  
USA  
Tel. : +1 973 882 5597  
Fax : +1 973 882 5178

#### **SEPPIC CHINA**

Room 510 Jin Tai Building  
58 South Mao Ming Road  
Shanghai 200020 CHINA  
Tel. : +86 (21) 64 66 01 49  
Fax : +86 (21) 64 66 11 09

#### **SEPPIC GmbH**

ABC Tower Köln  
Ettore - Bugatti - Str. 6 -14  
51149 Köln-Porz - GERMANY  
Tel. : +49 (0) 220 3890 3100  
Fax : +49 (0) 220 3890 3199

[www.seppic.com](http://www.seppic.com)

**Subsidiary of the AIR LIQUIDE group**

P/1836/GB/04/June 2004

## **ANEXO 2**

Especificaciones del extracto de aceituna según las indicaciones del fabricante.

MSDS



## Material Safety Data Sheet

### SECTION 1.- IDENTIFICATION OF SUBSTANCE / PREPARATION & COMPANY

**Product Code:** 40610

**Product Name:** Hytolive® Powder

**CAS Number:** NA

**Chemical Family:** Antioxidant

**Manufacturer Name:** Genosa I+D S.A.

**Address:** Parque Tecnológico de Andalucía  
C/Iván Pavlov 8 Edificio 1, 1ª planta, A  
29590 Campanillas. Málaga

**Telephone:** (+34) 952 02 85 80

**Fax:** (+34) 952 02 85 81

**Web site:** [www.genosa.com](http://www.genosa.com)

**e-mail:** [info@genosa.com](mailto:info@genosa.com)

### SECTION 2. COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS

Mean values of compounds distribution:

Carrier (Maltodextrins)	40,0-60,0%
Hydroxytyrosol	10,0-20,0%
Ash	1,0-8,0%
Other Phenolics	2,0-5,0%
Anticaking agent (SiO <sub>2</sub> )	0,1-2,0%
Water	0,1-3,0%
Flavonoids	0,1-1,0%
Other plant material	Rest up to 100%

### SECTION 3.- DESCRIPTIONS OF HAZARDS

**Eye Contact:** Non hazardous

**Skin Contact:** Non hazardous

**Ingestion:** Non hazardous

**Inhalation:** Irritation and coughing

### ANEXO 3

Valores del color instrumental del músculo *longissimus thoracic et lumborum* enriquecido en PUFA n-3 de corderos engordados con una dieta (D) incluyendo tres suplementos diferentes: control sin antioxidantes (C), 900 ppm de extracto de vino tinto (RWE) y 300 ppm de vitamina E (VE), en relación con el periodo de conservación (PC)

	PC Días	Dieta (D)			Media	Significación <sup>(1)</sup>		
		C	RWE	VE		D	PC	TxPC
<i>L*</i>	0	44,15±1,74 <sup>xy</sup>	41,97±1,65 <sup>x</sup>	44,83±1,74 <sup>x</sup>	43,65±0,99	ns	***	**
	6	43,91±0,97 <sup>x</sup>	42,56±0,92 <sup>x</sup>	43,33±0,97 <sup>x</sup>	43,27±0,55			
	12	47,25±0,88 <sup>by</sup>	47,07±0,83 <sup>by</sup>	44,35±0,88 <sup>ax</sup>	46,22±0,50			
Media		45,10±0,91	43,87±0,87	44,17±0,91				
<i>a*</i>	0	6,26±0,45 <sup>x</sup>	6,33±0,43 <sup>x</sup>	6,06±0,45 <sup>x</sup>	6,22±0,26	ns	***	***
	6	8,58±0,34 <sup>y</sup>	8,58±0,32 <sup>y</sup>	7,60±0,34 <sup>y</sup>	8,26±0,19			
	12	4,29±0,35 <sup>az</sup>	3,76±0,34 <sup>az</sup>	7,30±0,35 <sup>by</sup>	5,11±0,20			
Media		6,38±0,25	6,22±0,24	6,99±0,25				
<i>H*</i>	0	64,71±1,24 <sup>x</sup>	63,70±1,17 <sup>x</sup>	65,22±1,24 <sup>x</sup>	64,54±0,70	*	***	***
	6	61,30±0,85 <sup>y</sup>	61,41±0,80 <sup>y</sup>	62,59±0,85 <sup>x</sup>	61,77±0,48			
	12	75,55±1,24 <sup>bz</sup>	76,99±1,18 <sup>bz</sup>	63,80±1,24 <sup>ax</sup>	72,11±0,71			
Media		67,19±0,71	67,37±0,67	63,87±0,71				

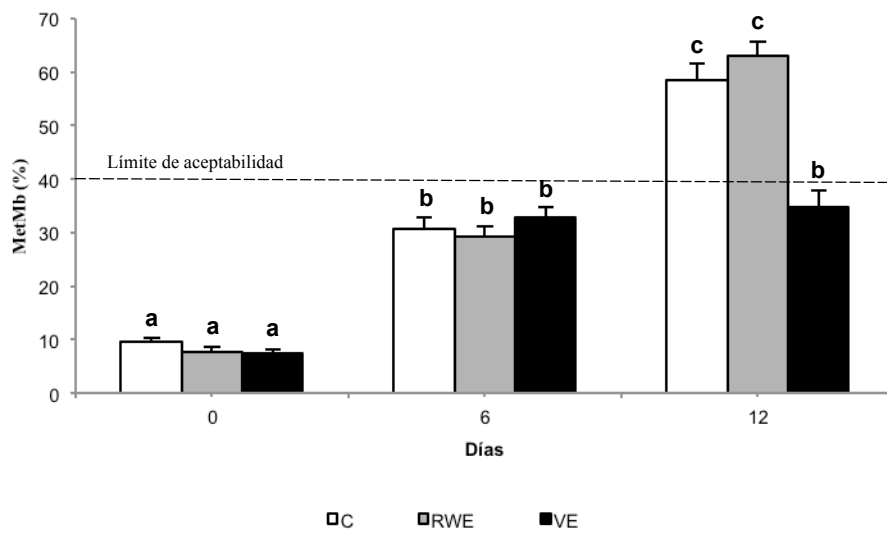
<sup>(1)</sup> ns,  $p > 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

<sup>a,b</sup> Letras diferentes dentro de la misma línea indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

<sup>x,y,z</sup> Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## ANEXO 4

Evolución del porcentaje de metamioglobina (MetMb) del músculo *longissimus thoracic et lumborum* enriquecido en PUFA n-3 de corderos engordados con una dieta incluyendo tres suplementos diferentes: control (C), extracto de vino tinto (RWE) y vitamina E (VE), en relación con el periodo de conservación (días)



## ANEXO 5

Contenido de PUFA LCh (EPA+DHA) en hamburguesas de cordero enriquecidas en PUFA n-3 conservadas en HiOx-MAP durante 9 días y formuladas con niveles diferentes de extracto de oliva (OE). CON: control sin OE adicionado, OE: 100 mg de OE GAE/kg carne, OE200: 200 mg de OE GAE/kg carne, OE400: 400 mg de OE GAE/kg carne

	PC	Tratamiento (T)				Media	ECM	Significación <sup>(1)</sup>		
		Días	CON	OE100	OE200			OE400	T	PC
EPA + DHA (mg/100 g carne)	0	91,2	99,5	90,9	102,7	96,1 <sup>a</sup>	25,5	*	***	ns
	3	87,8	91,8	131,1	111,0	105,4 <sup>a</sup>				
	6	68,6	64,2	64,8	88,1	71,4 <sup>b</sup>				
	9	17,4	47,4	41,5	46,6	38,2 <sup>c</sup>				
Media		66,2 <sup>x</sup>	75,7 <sup>xy</sup>	82,1 <sup>y</sup>	87,1 <sup>y</sup>					

<sup>(1)</sup> ns,  $p > 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

<sup>a,b</sup> Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

<sup>w,x</sup> Letras diferentes dentro de la misma línea indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

